581.87
Ab1c

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

MONOGRAFIAS DE CIENCIA MODERNA

31

CULTIVO DE ORGANOS CAULINARES AISLADOS

POR
JUAN BAUTISTA ABAD MANRIQUE
Y
CARMEN LUNA MORENO

1

INSTITUTO "JOSE CELESTINO MUTIS"
DE FARMACOGNOSIA

1 9 5 1

MONOGRAFÍAS DE CIENCIA MODERNA

TITULOS PUBLICADOS

Ptas.

1.—ESTADO METALICO Y ESTADO SOLIDO SEGUN LA QUIMICA FISICA MODERNA, por Salvador Senent Pérez. Agotado.

2.—GEOQUIMICA. Vol. I, por Angel Hoyos de Castro. (24 × 17), 98 páginas 20

3.—ASPECTOS QUIMICOS DE LA MODERNA TECNICA DE LOS CARBURANTES, por Juan L. de la Infiesta. (24 × 17), 84 páginas ... 20

4.—ORIGEN Y FORMACION DEL HUMUS, por José María Albareda. (24 × 17), 92 páginas 20

5.—INTRODUCCION A LA TEORIA Y PRACTICA DE LA POLAROGRAFIA, por Ramón Portillo Moya. (24 × 17), 128 páginas 20

6.—GEOQUIMICA. Vol. II, por Angel Hoyos de Castro. (24 × 17), 104 páginas 20

7.—BIOQUIMICA DE LOS ELEMENTOS, por Angel Santos Ruiz. (24 × 17), 112 páginas 20

8.—METODOS DE PROLONGACION ANALITICA DE LAS SERIES DE INTERPOLACION, por José Royo López. (24 × 17), 60 páginas. 20

9.—CONCEPTOS DE INTEGRAL, por Sixto Ríos. (24 × 17), 80 páginas. 20

10.—LIMNOSOCIOLOGIA, por Ramón Margalef. (24 × 17), 94 páginas. 20

11.—OCULARES, por María Egües y Pedro Giménez-Landi. (24 × 17), 76 páginas 20

12.—ALGUNOS ASPECTOS DE LA BIOQUIMICA DE PROTIDOS, por Angel Santos Ruiz y M. Sanz Muñoz. (24 × 17), 184 páginas 20

13.—INTRODUCCION A LA TEORIA CORPUSCULAR DE LA LUZ, por Ramón Ortiz Fornaguera. (24 × 17), 64 páginas 20

14.—GEOMETRIA DIFERENCIAL DE LOS ESPACIOS, por F. Botella Raduán. (24 × 17), 112 páginas 15

15-16.—LOS REACTIVOS ORGANICOS EN ANALISIS INORGANICO, Por José Barceló. Dos volúmenes. (24 × 17), 256 páginas 50

CULTIVO DE ORGANOS CAULINARES AISLADOS

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

MONOGRAFIAS DE CIENCIA MODERNA

31

CULTIVO DE ORGANOS CAULINARES AISLADOS

POR
JUAN BAUTISTA ABAD MANRIQUE
Y
CARMEN LUNA MORENO

1
INSTITUTO "JOSE CELESTINO MUTIS"
DE FARMACOGNOSIA
1 9 5 1

C. BERMEJO, IMPRESOR.—J. GARCÍA MORATO, 122.—TELÉF. 33-06-19.—MADRID

581.87
Ab-1c

PROLOGO

Desde que iniciamos nuestros trabajos sobre la técnica «in vitro», constituyó una de nuestras inquietudes estudiar ampliamente «el cultivo de órganos caulinares aislados» en razón de lo muy empírico y poco determinado que se encontraba. Actualmente, habiendo conseguido por primera vez en la citada técnica, y en calidad de única referencia en tal sentido, el desarrollo «in vitro» satisfactorio (definitivo e indefinido) de meristemos caulinares de *Atropa-Belladonna* L., ofrecemos en esta aportación una consideración conjunta y comparativa, tanto de las propias experiencias realizadas como de los restantes aspectos concernientes a este transcendental y moderno tema propio de la Fisiología Vegetal.

Y en atención a conseguir una exposición que, aun siendo esencial y primordialmente experimental por propio imperativo de sí misma, sea lo más adecuada posible a las finalidades de una Monografía se normaliza ésta, después de hacer resaltar los motivos e importancia que le afectan de por sí, atendiendo a los siguientes aspectos: TEORICO con el título de «actual estado del cultivo de tallos «in vitro»; TECNICO intitulado «consideraciones técnicas del mismo»; EXPERIMENTAL con la denominación de «experiencias y resultados» y CRITICO transcrito como «discusión e interpretación de los resultados» y «conclusiones».

Madrid, noviembre 1950.

LOS AUTORES

INTRODUCCION

La relativa modernidad de la técnica *in vitro* se compensa con la gran fecundidad de los investigadores en ella especializados (White, Gautheret, Robbins, Morel, Nobecourt, Camus, Gioelli, Bonner, Devirian, Duhamet, Loo, Bartley, Maneval, etcétera), quienes la extienden a un crecido número de especies vegetales pero, sin embargo, manteníanse con referencias empíricas e insuficientes dos de sus principales aspectos: el cultivo *in vitro* de tejidos de monocotiledóneas y el de órganos caulinares.

El primero ha sido, recientemente, resuelto por M. George Morel (1950) cultivando dos Aroideas (*Amorphophallus Rivieri Dur.* y *Seuromatum guttatum Schott*), utilizando la leche de coco como estimulante orgánico, pero no el segundo, pese a los esfuerzos e importantes aportaciones de varios autores (Robbins, White, Gautheret, Smith, Loo, Camus, De Ropp, Ball, Clement, etc.), al no obtener más que datos y hechos, unos muy parciales otros bastante deficientes y, casi siempre, poco concordantes y, aun más, casi exclusivamente referidos al estado definitivo de los cultivos caulinares, pero no al indefinido, el cual es de gran importancia, por representar una de sus primordiales finalidades en razón de que en él hay que mantener, además de la vitalidad de la cepa, el ritmo proliferativo propio de la especie vegetal de que se trate.

Adquiere gran importancia la elucidación de tal cuestión si se consideran que es, a su vez, base de problemas muy relevantes en Fisiología Vegetal, tales como *incapacidad* o *capacidad absorbente de los órganos caulinares, nutrición de los mismos, diferenciación* y *desdiferenciación celular, polaridad, potencialidad de desarrollo, capacidad* de *organización,* algunos aspectos de la *inhibición* y de la *dominancia* del *desarrollo,* ciertos aspectos de la *respiración,* etc.; problemas que radican y forman parte, a la vez, en una estricta área experimental.

Y, precisamente, por así considerarse la solución de tales problemas indujo a importantes y diversas experiencias que, al tratar de resolverlos por distinta técnica, crean los tres únicos métodos propios del cultivo *in vitro* de tallos: el de Robbins (1922), el de White (1933) y el de Gautheret (1940). Sin embargo, corresponden a Loo (1945), sobre *Asparagus officinalis L.*, los resultados más concretos aunque faltos de continuidad, tanto en lo que a otras especies vegetales se refiere como a otros autores, por lo que cabe considerarlas, por únicas y aisladas, con carácter de excepción hasta tanto no abunden, ratificándolas o no, el suficiente número de datos que precisan las ciencias experimentales.

Evidénciase, pues, la trascendencia que tiene la resolución del cultivo definitivo e indefinido de órganos caulinares y, por tanto, el lograr una técnica capaz, por su detalle técnico y por su fundamento, de ser generalizada a los diversos vegetales como método que haga asequibles de estudio los importantes problemas citados.

A tal fin destinamos parte de nuestras experiencias en el cultivo *in vitro*, ensayando con órganos caulinares de *Atropa Belladonna L.*, en razón de estar utilizando el cultivo de sus órganos radiculares como método para el estudio e investigación de la biogénesis de sus alcaloides tropánicos (1).

Al conseguir satisfactorios resultados en el cultivo de tales órganos caulinares, tanto para el estado definitivo como para el indefinido, y el haber tenido que introducir para ello un *método técnico propio*, factible de generalización, motiva esta publicación para dar cuenta de cómo por primera vez, en la técnica *in vitro*, se obtiene de modo satisfactorio el cultivo de órganos caulinares en la citada especie vegetal, normalizando su exposición así:

I.—Introducción.

II.—Actual estado del cultivo de tallos «in vitro».

---

(1) Luna Moreno, C.: *El cultivo de raíces aisladas de* A. Belladona *L. como método en la investigación de la génesis de sus alcaloides*. Tesis doctoral (1950). «Farmacognosia», núm. 19, 1951.

III.—Consideraciones técnicas del mismo.

a) Condiciones nutritivas.
b) Preparación previa de la cepa caulinar.
c) Técnicas ensayadas.

IV.—Experiencias y resultados.

A) Método de White.

1) Medio A de Gautheret.
2) Medio White I líquido.
3) Medio White I sólido con oligoelementos.

A_1) Resultados.

B) Método de Gautheret.

4) Medio A de Gautheret.
5) Medio White I para tallos.

B_1) Resultados.

C) Método propio.

6) Medio A de Gautheret.
7) Medio White I sólido.
8) Medio White I sólido con oligoelementos.
9) Medio A de Gautheret con ac. β-indol acético.
10) Medio White I sólido con ac. β-indol acético.
11) Medio White I sólido con oligoelementos y ac. β-indol acético.
12) Medio White I sólido con vitaminas B_1 y B_6.
13) Experiencias en la obscuridad.

V.—Discusión e interpretación de los resultados.

VI.—Conclusiones.

VII.—Bibliografía.

En primer lugar, se atiende *al actual estado de la breve bibliografía* existente sobre el citado cultivo la que transcribe datos deficientes, insuficientes y discrepantes por lo que realizamos seguidamente después una *revisión experimental,* crítica y comparativa, de los tres únicos métodos existentes, incluyendo las técnicas mediante las cuales se realizan las experiencias, en evitación de repeticiones posteriores inevitables, para luego exponer ya las *experiencias en sí* con sus *resultados* que son, sucesivamente, *discutidos e interpretados* para inferir *las conclusiones* obtenidas. En todo momento procúrase comparar el *método propio* (su eficiencia, bondad, ventajas y resultados) con los otros utilizados, a fin de demostrar la necesidad y la utilidad, a la vez, que en la técnica *in vitro* representa poder disponer de una satisfactoria técnica operatoria que permita lograr el estado definitivo e indefinido de órganos caulinares cultivados aisladamente.

II. Actual estado del cultivo de tallos «in vitro»

El cultivo *in vitro* de tallos deriva del meristemo caulinar, quien, por ser de naturaleza primaria, no está constituído por un conjunto tisular fisiológicamente homogéneo como los secundarios sino, al contrario, tiene una *organización compleja* con un potencial de *diferenciación determinado* capaz de motivar por progresivo desarrollo el órgano del cual deriva; pero en el caso del tallo su meristemo presenta, además, dos agregaciones de células embrionales correspondientes a los esbozos foliares que, por análogas razones, forman las hojas. Por esta coexistencia el meristemo caulinar, en su desarrollo *in vitro*, origina formaciones foliares además del tallo en sí, es decir, se obtiene un cultivo de órganos caulinares en general y, es más, aun pueden producirse tallos floridos si el esbozo fuera floral en vez de foliar.

El cultivo *in vitro* de todo meristemo caulinar para ser satisfactorio debe desarrollar, en las condiciones de tal técnica, tallos con hojas y éstas han de serlo, según disposición inherente a la naturaleza de la cepa caulinar sembrada, lo que condiciona deban obtenerse plántulas similares en morfología, organografía, histología y fisiología a las crecidas en tierra en condiciones naturales.

El cultivo de tallos aislados se caracteriza, hasta la actualidad, por un manifiesto retraso respecto al de órganos radiculares, hasta el extremo de que el mismo Gautheret, aun en 1942, afirma son muy pocas, relativamente, las tentativas que sobre él se realizaron y, a lo sumo, considera a Robbins y White, advirtiendo es de mayor importancia, todavía, que el propio retraso técnico el que los resultados obtenidos sean poco importantes y así es, en efecto, aun en la actualidad particularmente para la resiembra de tales cultivos por cuanto está sin conseguir, a satisfacción y con suficientes datos experimentales, el estado indefinido.

Evidénciase, pues, imperfección técnica así como una infructuosidad para lograr satisfacer las condiciones materiales, nutritivas y técnicas que exigen y determinan los meristemos

caulinares para su desarrollo *in vitro*. Aquí radica, precisamente, la trascendencia de *crear un método técnico* adecuado que satisfaga aquellas condiciones con fundamento fisiológico, no como caso empírico ni tampoco como hecho aislado, alcanzando las finalidades del cultivo caulinar.

Quizás por tal infructuosidad sea el número de experiencias, a tal fin destinadas, menos numerosas de lo que es de desear, así como la *insuficiencia técnica* quepa responsabilizarla en causas difíciles de eludir e importantes en el campo fisiológico. Entre las causas que merecen ser atendidas, en razón de las consecuencias que pueden motivar, según las finalidades de esta aportación, se tienen: 1) Que *la toma de la cepa biológica,* meristemo caulinar en esencia, sea todo lo aséptica que por propia condición exige la técnica *in vitro*. Si así no ocurre, queda inutilizado todo intento experimental. 2) Que la cepa se *aisle, tome* y *siembre* totalmente inerme, sin traumatismos ni lesiones, a fin de que conserve inalterado su natural funcionalismo. De producirse cualquiera de aquellos accidentes, la alteración sería inmediata y el cultivo se desarrolla obedeciendo a signos distintos de los normales (efectos de restitución, reparación, regeneración, etc.). 3) Que la cepa biológica tenga *vitalidad perfecta*, a fin de que así se conserve *in vitro*. Cualquier estado de vitalidad más o menos parcial motiva parciales necrosis que, la mayoría de las veces, tienden a ocasionar la muerte del cultivo. 4) Que la *técnica operatoria* sea lo suficiente asequible, cómoda y rápida que permita ensayarse continuada y sistemáticamente. Ello es, en el campo experimental, de la mayor trascendencia y más para la técnica *in vitro* por las dificultades que encierra el satisfacer las distintas condiciones de la misma (2) (local, recipientes, etc.). 5) Que el *método* permita conservar a más de la *vitalidad* de las cepas biológicas, su *capacidad de desarrollo* y su *potencial* de *diferenciación*. Alterado cualquiera de tales factores, no se obtendrá un desarrollo normal sino una evolución anómala dependiente de la calidad y medida en que aquellos factores fueron afectados. Por ello un inmediato análisis comparativo de los tres citados métodos (Robbins,

(2) ABAD MANRIQUE, J. B.ª y LUNA MORENO, C.: *Condiciones materiales del cultivo de tejidos vegetales.* «Farmacog.», vol. X, núm. 16, 37-57 (1950).

White y Gautheret) del cultivo *in vitro* de tallos justifica el porqué, aun habiendo representado valiosos avances, hayan motivado resultados deficientes en razón de corresponderle: al primero, una excesiva y larga manipulación sin ventaja posterior; al segundo, ciertas posibilidades de lesión, y al tercero, por ser indirecto, suministrar buenos resultados sólo de modo parcial (determinados vegetales y, aun dentro del mismo vegetal, en sólo ciertas épocas de su ciclo vegetativo) (Clement, 1949), y la falta de potencia de organización de las yemas neoformadas quizá por ausencia de alguna sustancia con esta específica función. Y, aún, resaltan más tales hechos negativos si se tiene en cuenta que sólo conciernen al estado definitivo, pero no al indefinido, quien se mantuvo inaccesible a tales métodos.

Es también de consideración la influencia de las condiciones nutritivas al no lograrse la nutrición óptima que exige el crecimiento y posterior desarrollo de los meristemos caulinares (3).

Las dificultades para determinar el medio nutritivo óptimo de los meristemos caulinares *in vitro* radican en que permanecen sin aclarar todavía bastantes puntos de su nutrición, por lo que adquieren interés algunos de sus aspectos: *a*) Si el meristemo caulinar es o no capaz de nutrirse de forma directa, es decir, si los órganos caulinares tienen *capacidad de absorción* por ellos mismos (hipótesis de Ball) o si, al contrario, sostienen *incapacidad* en tal función (hipótesis de Gautheret y De Ropp). *b*) Si es precisa la formación previa de un órgano destinado a ejercer tal función absorbente, es decir, si hay necesidad de una *anterior rizogénesis* para el desarrollo *in vitro* de órganos caulinares. Según sea lo cierto, se condicionaría o no el crecimiento de los órganos caulinares a la aparición de los radiculares. *c*) De confirmarse lo anterior, cabría orientar el cultivo de tallos hacia las exigencias de nutrición de tal rizogénesis pri-

---

(3) Abad Manrique, J. B.ª y Luna Moreno, C.: *Nutrición en el cultivo vegetal «in vitro». I.—Agua, sales inorgánicas carbohidratos y sustancias excitoformadoras.* «Medicamenta», año III, núm. 38 (1951). *Nutrición en el cultivo vegetal «in vitro». II.—Complejos orgánicos, aminoácidos, sustancias coagulantes y exigencias nutritivas propias de la preparación del medio, fase técnica, estado del cultivo y naturaleza de la cepa biológica.* «Medicamenta», año III, núm. 39 (1951).

meramente y, aun después, coordinar éstas con las inherentes a los órganos caulinares.

Por otra parte, la nutrición de éstos es distinta según se proceda con métodos directos o indirectos. En los primeros las exigencias son las generales propias de los estados definitivos e indefinido, mientras que en los segundos débese atender, además y anteriormente, a otra finalidad, la neoformación o aparición de formaciones meristemáticas en otra clase de material biológico (*liber, cambium* de raíz o de tronco de árboles, según Gautheret, y raíces en nuestra propia técnica) factibles de convertirse en cepas caulinares. En consecuencia, las condiciones nutritivas serán distintas, según la fase técnica, pero siempre es de desear conseguir una pauta racional y causal para satisfacerlas satisfactoriamente, tanto en la neoformación de yemas en los métodos indirectos, como para los estados definitivo e indefinido propios de los directos y también de los indirectos.

Estas consideraciones denotan y fundamentan a la vez las dificultades e imperfecciones técnicas que soporta el cultivo de tallos, así como valorizan las tentativas que se hagan para eludirlas, estudiarlas y para aclarar los problemas fisiológicos que motivan y en que radican. Y este interés se acrecienta, ya que no afecta sólo a la técnica *in vitro,* sino a la propia Fisiología experimental, por existir trabajos y experiencias realizadas en plantas normales que señalan a los órganos caulinares aislados como muy apropósito para el estudio de un sinnúmero de funciones y procesos fisiológicos, en los cuales descansan los más relevantes problemas biológicos (*incapacidad* o *capacidad absorbente, nutrición, diferenciación* y *desdiferenciación celular, polaridad, potencialidad de desarrollo, capacidad de organización,* algunos aspectos de la *inhibición y dominancia* del desarrollo, *respiración,* etc.) y de que tales problemas han sido, y son, objeto de la más interesada atención deriva el hecho de existir encontradas y contradictorias hipótesis sobre los mismos, emitidas por los numerosos autores que los trataron experimentalmente desde 1915 hasta nuestros días (Child, Thoday, Smith, Esau, Gautheret, Camus, Ball, Boell, Church, Wardlaw, Sterling, etc.).

Obsérvase que las causas e impedimentos responsables del

retraso técnico del cultivo *in vitro* de órganos caulinares respecto al de otros órganos no han sido hasta la fecha satisfactoriamente resueltos con suficiente fundamento fisiológico, pues la serie de experiencias que sobre el mismo se verificaron concluyeron todas ellas, a excepción de muy pocas, en resultados poco importantes, contribuyendo por ello quizá más a aumentar la importancia de tales impedimentos, de método y de técnica, que no a elucidar tales hechos en sí.

De estas experiencias resaltan a fines descriptivos las que pueden informar, por su interés y orientación, sobre la evolución experimental del cultivo *in vitro* de órganos caulinares. Así, cabe considerar primeramente las de Rechinger (1893) al intentar cultivar yemas caulinares de varios vegetales (*Populus nigra, Fraxinus ornus,* etc.) en arena con resultados muy deficientes, pues no aparecen formaciones radiculares sino tan sólo un pequeño callo en la porción basal y una ligerísima expansión en las partes superiores así como, análogamente, los ensayos realizados por Goebel (1908), con yemas aisladas de *Ceratopteris thalictroides,* que indican un cierto avance al formarse hojas, aunque éstas son muy diminutas y, morfológicamente, más simples que las normales.

Por tratarse las anteriores experiencias más de cultivo aislado que *in vitro,* es Robbins (1922) quien por primera vez aborda el cultivo *in vitro* de meristemos caulinares, y por ello cabe considerar como más importantes sus experiencias. Estas lo son ya en condiciones asépticas totales y utilizando medios azucarados (agar glucosado), en donde siembra fragmentos apicales de tallos (1,75 a 3,75 cm.) de guisante, maíz y algodonero en la oscuridad. Los cultivos originan formaciones caulinares muy pequeñas, con hojas no verdes y numerosas raíces.

Posteriormente White (1933), con método de siembra propio y utilizando la técnica de gota pendiente (cámara húmeda de Koch), cultiva extremos caulinares de 0,1 mm. con una longevidad de unas seis semanas mostrando aunque ligera, alguna diferenciación. El crecimiento de sus cepas biológicas producen un aumento de tamaño muy lento, originando un tejido heterogéneo con esbozos foliares, a modo de hojitas primarias y, a veces, incluso esbozo de yemas florales; pero, en cambio, no se produce nunca raíz. White, al considerar el poco

crecimiento producido admite que hubo una división celular, pero no, o los hubo muy raramente, procesos de hipertrofia, por lo que tales resultados, siendo de transcendencia, por ser iniciales en su finalidad no pueden, sin embargo, ser tenidos como satisfactorios, ya que la vitalidad *in vitro* (estado indefinido) es siempre muy limitado (seis semanas) y, además, nunca se neoformaron plantas completas (estado definitivo).

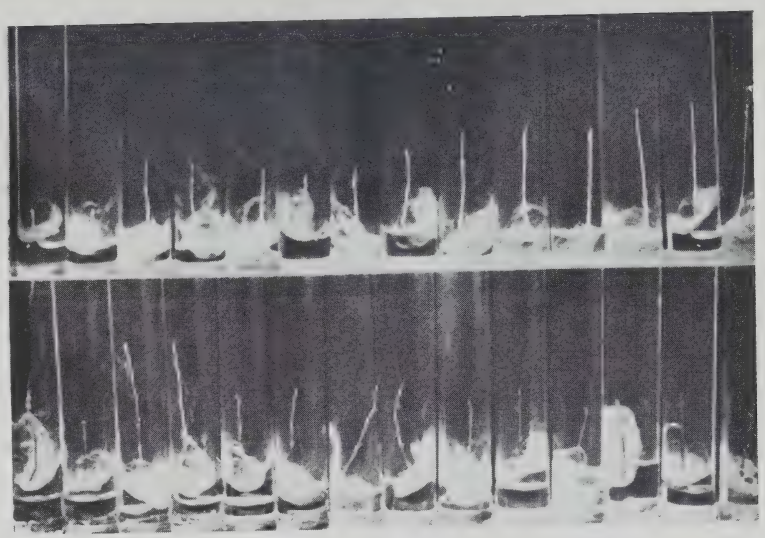
La Rue (1936), con fines más amplios, cultiva fragmentos de tejidos de 0,5 mm. a mm., de diversos materiales y especies vegetales (bases de cotiledones, ápices caulinares, de *Taraxacum officinale, Chrysanthemum leucanthemum, Lactuca canadensis, Lycopersicum esculentum* y yemas de hojas basales de *Radicula aquatica*), sobre agar estéril o en medio nutritivo líquido, evidenciando la formación de raíces y de ciertas formaciones caulinares, pero sin realizar resiembras, aunque es también como los dos primeros casos citados, un cultivo aislado tan sólo, e igualmente lo son las experiencias de Segelitz (1938) sobre agar estéril con ápices caulinares de maíz de 1 a 4 cm. de longitud.

Denótase que excepto las particulares experiencias de Robbins y White, verdadera iniciación del cultivo caulinar *in vitro,* las demás poco o ningún avance representaron por tanto, de modo absoluto, cabe considerar como muy moderno tal cultivo y a Gautheret (1940) como uno de los que primeramente lo ensaya de modo claro, al estudiar la formación de yemas en tejido cambial de raíz, admitiendo que las yemas caulinares son incapaces de absorber directamente elementos nutritivos del medio en su desarrollo *in vitro,* precisando la anterior formación de raíces adventicias aunque, posteriormente, advierte pueden existir excepciones, tales como el tallo de Endivia. Gautheret emplea un método original propio para cultivo de ápices caulinares que, como oportunamente se discutirá, es una técnica indirecta de siembra, opinando al lograr cultivos todavía muy incompletos (poca longevidad y sin resiembras) en su opinión, el desarrollo *in vitro* de los órganos caulinares debe ser factible de realizar a medida que se avanza en perfeccionamientos técnicos. Y, quizás por prestar más atención a otras finalidades, no aportó resultados más concluyentes a tal fin, como lo hace para otros problemas fisiológicos estudiados en órganos caulinares tales como *polaridad* en tejidos de Endivia, *formación de yemas* en tejido cambial de *Ul-*

PERCENTAGE OF SUCROSE

DARK

LIGHT



Fotocopia (A), (según Loo).

mus campestris en relación con el aporte nutritivo hidrocarbonado y la luz, *acción de la vitamina* B_1 y de las *heteroauxinas*, asignando acción indiferente a la primera y de fuerte inhibición a las últimas sobre el anterior proceso.

En el mismo año Smith cultiva extremos caulinares de *Helianthus annuus* (0,55 a 4 mm.) en agar con solución White I para estudiar el efecto que sobre la velocidad de desarrollo motivan varios factores accesorios de crecimiento al ser adicionados al medio.

También Guy Camus (1944) se aparta de la concreta orientación en sí (conseguir los estados *definitivo* e *indefinido* de tallos) al estudiar la acción organizadora en tejidos subyacentes que pueden ejercer las yemas caulinares provocando, en tubérculo de *Chicorium intybus var. Witloof*, la formación de yemas y raíces concluyendo existe acción de tal clase al producirse elementos conductores y, además, ésta se manifiesta en la dirección hoja-raíz, admitiendo como posible sea debida a la reacción motivada en los tejidos del tubérculo por alguna sustancia organizadora más o menos determinada.

Por concretarse a las finalidades indicadas son de interés las experiencias de Loo S. W. (1945-1946), quien consigna haber logrado el crecimiento ilimitado *in vitro* de tallos de *Asparagus officinalis L.*, resaltando primeramente, y como muy importante, los pocos progresos que hasta la fecha cabe asignar al cultivo caulinar *in vitro* para luego, mediante el método de Robbins (germinación aséptica), cultivar extremos de tallos de 5 a 10 milímetros de longitud en medio líquido primero, pero en posteriores trabajos admite la ventaja del medio sólido al no precisar de lana de vidrio como soporte. Concluye que tales órganos caulinares pueden crecer continuadamente *in vitro* a la luz, mejor si la luz es artificial fluorescente, que no a la luz difusa y más todavía que a la oscuridad, por lo que considera a los tallos con capacidad de absorción directa para su crecimiento *in vitro* y sin necesitar previo enraizamiento.

Dada la importancia que en la citada finalidad podían tener estas experiencias parece un tanto paradójico que no se hubiera sacado el provecho que era de esperar y, también, que investigaciones posteriores las considerasen poco o incluso nada.

Son tales experiencias el primer dato satisfactorio sobre el

cultivo *in vitro* indefinido de tallos pero, como observa el propio autor, adviértese la particular naturaleza caulinar del *Asparagus* por sus reducidas hojas que, crecidas *in vitro,* lo son más, por no producir, excepto en dos casos aislados, raíces adventicias y que, precisamente, en tales casos de excepción se evidencia una mayor velocidad de crecimiento que en los cultivos sin raíces (caso general) así como, por último, pero de gran trascendencia por la finalidad de que se trata, que el desarrollo alcanzado por crecimiento indefinido de la cepa biológica sea tan reducido que difícilmente puede compararse con el de plantas normales. Ello se demuestra observando la fotocopia A, único registro que de tales cultivos incluye el trabajo original, en donde, además, puede denotarse que los cultivos lo son en medio líquido y dentro de tubos de ensayo como recipientes.

Posteriormente, el mismo autor, con idéntica técnica, trata de cultivar *in vitro* un vegetal heterotrofo, la *Cuscuta campestris,* pero se aparta un tanto de la orientación anterior y, por tanto, de la nuestra propia en razón quizás de ser una planta heterotrofa y estudiar los efectos de numerosas sustancias sobre su desarrollo.

Estos ensayos, en nuestra opinión, siendo muy importantes, no representan el establecimiento *definitivo* del cultivo de tallos *in vitro,* dado que todavía existen muchos puntos sin conseguir. Puntos que son de gran transcendencia como el lograr un *crecimiento muy inferior al normal,* que los cultivos en general estén *exentos de raíces,* que el *porte de las plantulas* originadas sea *muy diminuto,* etc., por lo que es, más bien, la iniciación de la verdadera posibilidad que muestra al cultivo de tallos como factible de conseguir de forma sistemática y totalmente satisfactoria.

El mismo año en que Loo da cuenta de su primer ensayo (1945), De Ropp cultiva tallos de centeno, apreciando que *in vitro* desarrollaron tan sólo la primera hoja y cuando formaron raíces, lo que ocurre raramente, el crecimiento es mucho más normal, por lo que el meristemo caulinar, afirma, no está fisiológicamente adaptado para la absorción directa de nutrientes en las condiciones *in vitro.* Nótese que ello ratifica la misma autorizada opinión de Gautheret así como se opone, en parte, a la emitida por Loo, motivando que los datos de este último autor sean considerados como «un *tanto aislados y necesarios de confirmación en otros más normales vegetales*».

Ball (1946) cultiva extremos caulinares de *Tropaeolum majus L.* y *Lupinus albus L.*, en medio líquido de Pfeffer adicionado de ciertos oligolementos (Bo, Mn, Zn, Cu, Fe, Mo) a la luz y a la oscuridad, y, también en el mismo medio solidificado por agar, en donde evidencia resultados menos satisfactorios, pero las finalidades de sus experiencias no son el propio cultivo *in vitro* en sí, sino utilizarlo como método para estudiar ciertos problemas fisiológicos como polaridad, velocidad de desarrollo, morfología, respiración, etc., y por ello sólo opera en cultivos de siembra, nunca con los de resiembra, y los primeros solamente alcanzan una *longevidad más o menos limitada.*

Particular interés tiene, en razón de la naturaleza de nuestro método original, la observación que consigna, por primera vez y como algo de excepción, Nobecourt (1946) al estudiar formaciones de naturaleza caulinar y foliar en cultivos de raíces de zanahoria al denotar se producen frecuentemente protuberancias indiferenciadas pero, raramente, aun tratándose de raíces viejas, pueden producirse yemas capaces de motivar hojas y advierte la extrañeza de que tal fenómeno no haya sido anteriormente citado, ni con carácter informativo siquiera, por otros autores que cultivaron *in vitro* raíces de dicotiledoneas.

Como era de esperar, el proceso de formación de raíces en cepas caulinares *in vitro,* consignado por Loo, es objeto de posterior atención por otros autores, entre los que Galston A. W. (1948) considera la fisiología de tal proceso en relación con la influencia ejercida por el ácido β-indol acético y la luz, concluyendo que en ausencia de la heteroauxina se produce rizogénesis rara vez, pero con su adición la hay al cabo de algunas semanas, a condición tan sólo de mantener los cultivos en la oscuridad, pues aquélla es muy débil a la luz. Hace responsable a las raíces del crecimiento activo de los órganos caulinares a causa de alguna sustancia específica en ellas formadas, pero si los cultivos permanecen prolongadamente en la oscuridad (varios meses) entonces, los tallos pierden la facultad de enraizar, como respuesta a la adición del ácido β-indol acético, pudiendo el crecimiento del tallo continuar, pero muy lentamente, considerando que la relación que tal substancia pueda tener con la rizocalina de Went es todavía punto de discusión.

Liu Ta-chu (1949) cultiva extremos de vástagos de Zea mays

en medio White líquido evidenciando hay producción de raíces en sus nudos, tanto a la luz como en la oscuridad, concretando que la rizogénesis se produce tan sólo a temperaturas de 20-24° C., pero no a 34-35° C.

En el mismo año, Jaquiot C. M. (1949), en tejido cambial de *Ulmus campestris,* trata de aclarar los problemas fisiológicos concernientes a la formación de yemas, ya anteriormente abordados por Gautheret, demostrando es tal proceso producido sólo en ciertos casos y, aun en éstos, en determinadas épocas, por lo que admite la existencia de una substancia facultada para declinar la organización inherente a los meristemos caulinares; substancia que no estaría presente en dosis eficaces para tal proceso de modo continuo en el tejido cambial, sino tan sólo alcanzaría tales proporciones en ciertas épocas o casos dependientes, tal vez, de la distinta actividad del ciclo vegetativo de las plantas.

Las consideraciones y la evolución experimental del cultivo de tallos *in vitro* patentizan un *actual estado deficiente e incompleto,* pues tan sólo una *única vez* se consigna la obtención del estado indefinido, quizás demasiado particular, estando sin aclarar muchos de los problemas y hechos técnicos del propio cultivo, puesto que el *crecimiento es muy lento,* el *tamaño de las plantulas muy pequeño* y, también, sostiene ciertas *contradicciones en algunos procesos* complementarios de probada importancia, como la *rizogénesis, absorción, estado del medio,* etc.; tal estado insatisfactorio es mucho mayor en las demás experiencias al obtener *sólo el estado definitivo* de modo limitado (longevidad corta de la cepa biológica) y también al no haber sido orientadas hacia las finalidades del cultivo *in vitro,* sino más bien tomándo éste como medio o método facilitador de otros estudios e investigaciones transcendentales en Fisiología vegetal por ofrecerse los tallos aislados muy idóneos a tales fines.

Por tanto, ofrece interés contribuir a aclarar tal cuestión experimental por lo que *nos propusimos* resolver tales puntos en un vegetal, cuya fisiología pudiera tenerse como normal y sus aplicaciones fueran de importancia farmacéutica. Elegimos la *Atropa Belladonna L.,* de la cual disponíamos, además, de raíces cultivadas por primera vez por nosotros en la técnica *in vitro* para estudiar en las mismas la biogénesis de sus muy importantes alcaloides en experiencias anteriores (1948-50).

Si bien la originaria finalidad de nuestras experiencias fué conseguir el cultivo *in vitro* de órganos caulinares de belladona, atendimos también, por el especial interés que representan los siguientes puntos: 1.° *Crear un método* para el cultivo *in vitro* de tallos que pudiera ser extendido sistemáticamente a otros vegetales a fin de poder lograr de modo fisiológicamente causal el cultivo de órganos caulinares. Para ello se realizó un estudio crítico experimental de los métodos existentes y del nuestro propio. 2.° *Determinar las condiciones nutritivas* más óptimas del desarrollo *in vitro* de los meristemos caulinares a fin de así poder suministrarles los elementos que necesitan para mantener su vitalidad y su ritmo proliferativo. 3.° *Concretar* cuáles y de qué modo han de ser satisfechas las condiciones *materiales* y *físicas* de tales cultivos. 4.° *Precisar* la acción *influenciativa* que ejercen ciertas substancias estimulantes de uso general (heteroauxinas y vitaminas) sobre las cepas caulinares. 5.° Estudiar de modo crítico el *comportamiento fisiológico* de los procesos y hechos que los tallos manifiestan en su desarrollo *in vitro*. 6.° *Intentar interpretar* tales procesos y hechos para con adecuada generalización contribuir a aclarar y elucidar, en lo posible, el *incompleto y deficiente estado que el cultivo caulinar «in vitro» soporta en la actualidad.*

III.—Consideraciones técnicas

Estas consideraciones, aun siendo consecuencia de las propias experiencias, por ser una discusión crítica de las distintas fases y detalles técnicos que en cada método se realizan, son aquí antes expuestas en evitación de las repeticiones técnicas que afectan a los métodos.

Se ordenan en tres grupos según conciernan a las *condiciones nutritivas,* a la *preparación previa* del material biológico para poder ser cepa caulinar y, por último, a la propia *técnica operatoria.*

a) *Condiciones nutritivas*

Tanto Robbins (1922) como White (1933), en su particular técnica de gota pendiente, utilizan para el cultivo caulinar *in vitro* medios nutritivos líquidos pero, posteriormente, se generaliza como más adecuado el estado sólido de los mismos, incluso por tales autores, e igual ratificación concierne a Loo al utilizar primeramente medio líquido y subsiguientemente después sustratos sólidos. Sin embargo, y pese a todo ello, no puede ni debe preconizarse una exclusión total, por lo menos hasta ahora, del estado líquido para tal clase de cultivos *in vitro.*

En sentido estricto, el primer medio nutritivo utilizado para el cultivo caulinar lo fué por Robbins empleando la solución de Pfeffer (1), más tarde modificada por otros autores por adición de ciertos oligoelementos (Zn, Bo, Mo, Cu), mejorando así los resultados alcanzados con la misma.

---

(1) *Solución de Pfeffer.*

Nitrato cálcico...	0,333 gr.	Cloruro potásico	0,042 gr.
Sulfato magnésico.	0,083 »	Fosfato monopotásico ...	0,06 »
Nitrato potásico	0,063 »	Sulfato férrico.	0,0025 »

Para un litro de solución (agua bidestilada).

White propone un medio de composición muy similar al utilizado en sus cultivos radiculares pero adicionando también oligolementos ; es el denominado Medio White para tallos (2), que, como transcribe su composición, no es un medio absolutamente sintético por contener un complejo orgánico-mineral (extracto de levadura), pero en cambio excluye toda otra sustancia estimulante o excitoformadora (vitamina o heteroauxina). De los resultados obtenidos por White, se tiene que tal medio líquido satisface tan sólo el mantenimiento de la vitalidad de las cepas caulinares de modo limitado (seis semanas solamente).

Gautheret (1940) inicia el uso del estado sólido, previa adición de agar a las soluciones nutritivas, empleando para el cultivo de tallos el medio llamado I de Gautheret para resiembras (3), el cual incluye tres sustancias estimulantes. Los resultados obtenidos con él denotan que son satisfechas ya algo más satisfactoriamente las exigencias nutritivas de los tallos *in vitro,* pero no es aún del todo suficiente, puesto que tampoco permite obtener con éxito las sucesivas fases de resiembra, o sea, el estado indefinido de los órganos caulinares.

---

(2) *Medio White para tallos.*

Nitrato cálcico..	0,1 gr.	Sulfhidrato de sodio... ...	0,023 gr.
Sulfato magnésico.	0,075 »	Sulfato manganésico... ...	trazas
Fosfato monopotásico. ...	0,0125 »	Sulfato de cinc	»
Cloruro potásico	0,0132 »	Acido bórico	»
Nitrato amónico	0,022 »	Glaucosa..	20 gr.
Sulfato férrico...	0,005 »	Extracto de levadura. ...	20 c. c.

Para un litro de solución (agua bidestilada).

(3) *Medio I de Gautheret (para resiembras).*

Sol. Knop (sin Fe) diluída a la mitad	1.000 c. c.	Sacarosa..	30 gr.
Sol. Berthelot modificada.	10 got.	Clorhidrato de cisteína ...	0,01 »
Agar-agar	13 gr.	Aneurina..	0,001 »
		Ac. b-indol acético.	0,00001 »

Ball (1946), para determinar el aporte nutritivo más idóneo en cultivos de tallos utiliza el medio de Robbins con oligoelementos (4)., que no es sino la solución de Pfeffer modificada, bien líquida o sólida, con relativamente buenos resultados para el estado sólido, pero muy deficientes para el líquido, aunque tan sólo referidos al desarrollo y crecimiento de los cultivos, pues tales cultivos son de poca longevidad y, al igual que le ocurre a La Rue (1939), nunca llega a obtener, incluso con medios sólidos, resiembras.

Existen, pues, criterios y opiniones distintas sobre las exigencias nutritivas de los tallos desarrollados *in vitro,* ya que los medios son de distinta composición y, en todos ellos, los resultados no son satisfactorios, sino bastantes deficientes, pero como característica general, en razón de los beneficios que su inclusión representa, se tiene la presencia de ciertos oligoelementos y también la acción favorable de algunas substancias excitoformadoras o estimulantes, bien en forma de complejo orgánico mineral (extracto de levadura) o como elementos de naturaleza química más definida (aminoácidos suplentes, vitaminas y heteroauxinas).

Atendiendo tal criterio y a los datos incompletos que suministraron las experiencias, nosotros ensayamos diversos aportes nutritivos, tanto en estado líquido como sólido, y después de las adecuadas tentativas previas, estudiamos la conveniencia e influencia de los oligoelementos, así como la de algunas substancias de función estimulante.

Los medios por nosotros ensayados fueron : Medio White I

(4) *Medio de Ball.*

Nitrato cálcico.	0 333	gr.	Acido bórico	0,06	mgr.
Sulfato magnésico	0,083	»	Cloruro de manganeso..	0,04	»
Nitrato potásico...	0,083	»	Cloruro de cinc	0,15	»
Cloruro potásico...	0,042	»	Cloruro de cobre.	0,05	»
Fosfato monopotásico...	0,083	»	Molibdato sódico.	0,03	»
Sacarosa.	20	»	Cloruro férrico	0,024	»

Para un litro de medio (agua bidestilada).

(propio para raíces) en sus dos estados, líquido y sólido (5); Medio White I líquido con oligoelementos (medio para tallos (2), y el mismo al estado sólido (6): Medio A de Gautheret (7); Medio A de Gautheret con ac. β-indol acético (8); Medio White sólido con ac. β-indol acético (9); Medio White sólido con oligoelementos y ac. β-indol acético (10); Medio White I sólido

---

(5) *Medio White I para raíces.*

Nitrato cálcico	0.142 gr.	Fosfato monopotásico ...	0,0125 gr
Sulfato magnésico	0,073 »	Sulfato férrico.	0,0025 »
Nitrato potásico...	0,081 »	Sacarosa.	20 »
Cloruro potásico..	0,065 »	Extracto de levadura. ...	20 c. c.

Para un litro de solución (agua bidestilada).

El medio *sólido* tiene igual fórmula, añadido de:

Agar-agar ... ... 13 gr. por litro

---

(6) *Medio White para tallos (sólido).* Igual fórmula que (2) añadido de:

Agar-agar ... ... 13 gr. por litro

(7) *Medio A de Gautheret.*

Sol. Knop diluída a la mitad	1.000 c. c.
Agar-agar	13 gr.
Sacarosa	30 »

(8) *Medio A de Gautheret con ac. β — indol acético.* Igual fórmula que (7) añadido de:

Ac. β-indol acético ... ... 0,001 gr. por litro

(9) *Medio White I sólido con ac. β — indol acético.* Igual fórmula que (5) añadido de:

Ac. β-indol acético ... ... 0,001 gr. por litro

(10) *Medio White I sólido con oligoelementos y ac. β — indol acético.* Igual fórmula que (6) añadido de:

Ac. β-indol acético ... ... 0,001 gr. por litro

con vitaminas B_1 y B_6 (11), con un total de nueve medios distintos ensayados, lo que permite considerar, de modo comparativo el modo de satisfacer las exigencias nutritivas de las cepas caulinares, así como estudiar y determinar las influencias que en el desarrollo *in vitro* motivan determinadas substancias.

La preparación de tales medios lo fué siempre, según técnica general y siguiendo las directrices particulares de nuestras anteriores experiencias.

Como recipientes de cultivo se utilizaron, en general, matraces erlenmeyers de 100 c. c., con cuello algo más amplio que los corrientes para la siembra, y de 250 c. c. para las resiembras conteniendo, aproximadamente, 1/3 de su capacidad total de medio, siendo las condiciones materiales las generales de nuestro laboratorio, así como según la finalidad, naturaleza y estudio de cada ensayo se expusieron a la luz artificial (lámpara fluorescente), luz difusa u oscuridad, mientras que la temperatura en la mayoría de las experiencias fué de 26-27° C.

b) *Preparación previa del material biológico*

Según como se realice esta fase previa se establecen diferencias esenciales en las técnicas del cultivo *in vitro* de tallos motivando los distintos métodos existentes, conocidos con el nombre del autor que los crea, que corresponden a Robbins, White y Gautheret. Estos métodos difieren no en la distinta forma de realizar la siembra, casi siempre según normas generales, sino en cómo se procede a aislar y tomar el material biológico convertido en cepa caulinar, por lo que se atiende a una preparación a fin de obtener la forma más adecuada posible y, en consecuencia, soportan tales métodos distintas técnicas de aislamiento que condicionan diferentes manipulaciones, de las cuales puede depender su bondad.

---

(11) *Medio White I sólido con vitaminas* B_1 *y* B_6. Igual que la fórmula (5) añadido de:

Vitamina B_1	0,001 gr.
Vitamina B_6	0,001 »

(por litro).

El *método de Robbins* es, quizás por ser el más simple, el más fácil de llevar a la práctica pero, en contraposición, exige amplio tiempo de duración, lo que motiva se le considere dilatado e incluso, inconveniente en casos que se precise cierta rapidez, bien por tratarse de ensayos sólo demostrativos o porque necesitándose un crecido número de los mismos, el ahorro del tiempo en cada uno de ellos es de gran valor. Esta duración se debe a que las cepas caulinares provienen de seccionar el meristemo caulinar de plantulas procedentes de germinaciones asépticas y, naturalmente, han de soportar siempre un período germinativo más o menos largo, pero de cierta duración, aparte de todos los inconvenientes de manipulación de las mismas, cuyo no cumplimiento deriva posteriores contaminaciones, por lo que se manifiesta como un método de resultados deficientes (4) (4 bis).

El de White, con el primordial fin de evitar la germinación aséptica, prefiere operar con mayor detalle manipulativo, pero partiendo de vegetales crecidos normalmente, de los cuales aísla una yema caulinar, terminal, axilar o incluso floral, procediendo después a extraer de ella cuidadosamente la zona meristemática, que admite es aséptica por estar protegida (hojuelas, brácteas o jóvenes piezas florales que la envuelven). En realidad, se precisa efectuar una verdadera disección de la yema caulinar para después, una vez aislada la zona meristemática, seccionar una parte de su ápice, no superior a 0,1 mm. de tamaño, y colocarla en cámara húmeda mediante análoga técnica a la bacteriológica de gota pendiente.

Evítase así la germinación aséptica subsanando con ello una de las dificultades primordiales del método de Robbins, pero, en contraposición, deben exagerarse los cuidados asépticos del instrumental y recipientes de cultivo, así como manipular con gran delicadeza y perfección en la disección de la yema que, dada sus exiguas dimensiones, precisa realizarse bajo protección en caja Petri, sobre platina de binocular y con instrumentos muy finos y precisos, pero aun así son frecuentes las lesiones, pro-

---

(4) Abad Manrique, J. B.ª: *El cloro-hipoclorito cálcico como estimulante de la germinación.* «Farmacog.», núm. 14, 13-18 (1949).

(4 bis) Abad Manrique, J. B.ª: *Los antisépticos como estimulantes de la germinación.—II. Agua oxigenada.* «Ión», núm. 99 (1949).

vocadoras después de necrosis, capaces de inutilizar los cultivos así obtenidos. La dificultad de eludir tal causa o sus influencias, quizá sea la responsable de la poca longevidad manifestada por los cultivos de White, siempre de sólo seis semanas.

Sin embargo, este método demuestra que el material biológico es de por sí ya aséptico (*Stellaria media*), debido a la eficiente protección de los órganos caulinares que lo rodean por completo, evitando toda infección, lo que es de importancia en concepto de White, pues la esterilización del meristemo es imposible de obtener en absoluto por la gran fragilidad y delicadeza de los tejidos en la fracción caulinar apical. Análoga asepsia natural comprueba Ball (1946) (*Lupinus albus* y *Tropaeollus majus*), pero no así Keener (1945) quien, por el contrario, afirma la existencia de una microflora en las yemas de algunos árboles, hecho este último que Ball explica por el constante crecimiento de los tejidos apicales que motivaría, sólo accidentalmente, pudieran contener microorganismos.

El método de Gautheret es de todo punto indirecto, constando de dos primordiales y distintas fases técnicas: la primera, consistente en provocar la formación del órgano capaz de servir de cepa caulinar; tiene como finalidad transformar un órgano o fragmento vegetal no adecuado para desarrollar *in vitro* formaciones caulinares en otro que lo sea, para lo cual se recurre a una nueva formación de meristemo caulinar, y la segunda fase, ya regida por las normas generales de la técnica *in vitro*, consiste en el aislamiento y subsiguiente transferencia del meristemo, neoformado en la anterior, al medio de cultivo elegido. Se deduce que la asepsia se cumple de modo total por cuanto las cepas caulinares, al engendrarse *in vitro* por propia condición y naturaleza así han de ser.

La primera de las fases, neoformación de yemas, puede efectuarse con más o menos facilidades, según la clase, estado del cultivo y naturaleza del vegetal. Concretamente, Gautheret provoca la formación de yemas caulinares en fragmentos de liber radicular de Endivia, en forma de prismas o taleolas debidamente orientados para no influir su polaridad (a los doce a quince días comienza la aparición de pequeñas yemas) (5). Las yemas, una

(5) ABAD MANRIQUE y LUNA MORENO, C.: *El cultivo de tejidos vegetales*. «Anales de Farmacog.», núm. 13, pág. 279 (1948).

vez desarrolladas se siembran, previo aislamiento de los tejidos subyacentes, mediante normas generales.

Los resultados con este método son, en efecto, más satisfactorios que con los anteriores pero carecen de la uniformidad que es de desear, ya que se ha demostrado que el proceso formativo de yemas, tanto si se parte de tejido liberiano como de tejido cambial, no se realiza siempre con la misma facilidad y eficacia si no es dependiente de una serie de causas (especie vegetal, época de siembra, etc.), que deben ser tenidas como complejas y probablemente en función de influencias y fenómenos fisiológicos no aclarados todavía (Jaquiot C. 1949). Luego el método de Gauteret acrecienta notablemente las posibilidades del cultivo *in vitro* de tallos, pero no lo resuelve por cuanto depende, y por ello se limita su aplicación y bondad, de una serie de factores, esencialmente fisiológicos, que todavía sin aclarar son muy difíciles de eludir o resolver a satisfacción.

Además, tales yemas, en su desarrollo *in vitro,* evidencian un funcionalismo un tanto particular, algo desviado del normal, que, después de considerar los resultados por nosotros obtenidos, estimamos pueda depender de diversas causas o factores ; causas posiblemente intrínsecas e inherentes a las propias yemas en razón de su particular formación (formación anormal), potencialidad de desarrollo alterada, grado de diferenciación distinto, vitalidad afectadas, etc.

Por nuestros ensayos evidenciamos, como métodos más convenientes a propósito del cultivo caulinar, los de White y Gautheret, pues el de Robbins, de realización demasiado amplia por la germinación aséptica, queda relegado al demostrarse la asepsia natural del ápice meristemático caulinar. Estos dos métodos : el de White y el de Gautheret, si bien realizáronse fielmente en lo que es esencialmente su fundamento (distinta preparación para lograr la cepa), en las operaciones y manipulaciones accesorias fueron adaptados a las condiciones técnicas y materiales propias, así como para poder compararlos con nuestro método original, nos esforzamos soportaran similitud, la mayor posible en todo el ciclo experimental.

Concretamente en el de White, no utilizamos cámaras húmedas, sino recipientes de cultivo normales (matraces) que, por una parte, proporcionaba similitud técnica con los otros métodos, y

por otra, más importante, se ofrecía a la cepa mayor espacio ambiental, evitando el confinamiento propio de recipientes exiguos y el pronto agotamiento del medio nutricio que será, necesariamente, menos frecuente.

c) *Técnicas ensayadas*

A fin de que las experencias y resultados queden desprovistas de detalles de manipulación, que las dilatarían considerablemente y, a la vez, diluirían los resultados, haciendo menos directa su comparación, estudio y discusión crítica, exponemos aquí, previa y anteriormente, el modo técnico como procedimos en los tres métodos del cultivo de tallos *in vitro* ensayados.

c_1) *Método de White*

De plantas de Atropa Belladonna L. crecidas en tierra, de dos a tres meses de edad, se seccionan, mediante pinzas y tijeras estériles, las yemas caulinares (terminales y axilares), que son trasladadas inmediatamente a una caja Petri estéril, para allí, operando sobre platina de binocular, aislar por disección las zonas meristemáticas que contienen, protegidas por bracteas, hojuelas, etc., procurando no causar lesión alguna, así como mantener la máxima asepsia (instrumental y recipientes siempre estériles), por cuya última condición debe utilizarse una distinta caja Petri para cada capa de brácteas envolventes separadas. La zona apical meristemática aislada se secciona (1 mm. de la porción apical) con un fino bisturí, e inmediatamente se procede a trasladarla al medio de cultivo, o sea a su *siembra,* atendiendo lo fuera perpendicular a la superficie del medio y en su contacto estuviera la porción basal.

Aunque la discusión crítica de los ensayos es objeto del capítulo siguiente, anticipamos que hemos comprobado totalmente la asepsia natural que soporta el meristemo caulinar de la Atropa Belladonna L., y, por tanto, lo innecesario de ensayar el método de Robbins.

c_2) *Método de Gautheret*

Son utilizadas raíces de belladona crecidas en tierra, en análogas condiciones a las citadas que, una vez cortadas, se lavan

cuidadosamente, para desproveerlas de las partículas de tierra adheridas, siendo después fragmentadas en trozos de 6 cm., eligiendo los más idóneos, a los que se les priva de las raicillas secundarias, mediante tijeras estériles, y se les traslada a una caja Petri estéril, donde cuidadosamente son lavados con alcohol (sujeción mediante pinzas y lavado con trozos de algodón empapados) varias veces (4 ó 5), por frotamiento con la superficie externa. Luego se llevan a una segunda caja Petri para seccionarlos en discos circulares, o sea en taléolas de un milímetro de espesor aproximadamente, que ya constituyen las cepas de siembra en el medio sólido A de Gautheret; y estos cultivos, mantenidos a la luz y a 26-27° C. de temperatura, se destinan a neoformar las yemas caulinares. Estas empiezan a aparecer en la parte superior de las taléolas y a los doce días son patentes y factibles de aislamiento, por seccionamiento en su base, para ya transferirlas a un nuevo medio mediante nueva siembra, pues constituyen las cepas caulinares cuyo desarrollo *in vitro* se desea obtener.

Hemos obtenido mejores resultados con el alcohol que con el hipoclorito cálcico para aseptizar las taléolas radiculares, pues el uso del último proporciona más frecuente contaminación y, por otra parte, evidéncianse más eficiencia operatoria si, en vez de sembrar fragmentos radiculares de forma discoidal (taléolas), se utilizan primas. Estos pueden derivarse fácilmente de las taléolas, con tal de privarlas de las porciones corticales, aunque para un proceder sistemático, ofrece mayor comodidad mondar, no cada taléola, sino todo el fragmento radicular de 6 cm. primero (cual si se afilara un lápiz), y luego trocearlo en secciones de un milímetro de espesor. El que los primas permitan resultados más satisfactorios se debe a que la corteza es difícil de hacer aséptica, por lo que su eliminación evita las posibilidades de infección que pueda conferir tal dificultad.

c_3) *Método propio (original)*

El cultivo *in vitro* de tallos realizado con los anteriores métodos evidenció, al igual que anteriormente habíales ocurrido a otros autores, no ser del todo satisfactorio, tanto por sus resultados como por las operaciones y detalles técnicos que precisa-

ban (manipulaciones excesivamente complejas, infecciones más o menos frecuentes, excesiva amplitud de instrumental o de ciclo experimental, deficiencias nutritivas, etc.). Por otra parte, estudiando el desarrollo y comportamiento *in vitro* de raíces de belladona, observamos ciertos hechos que nos hicieron prever la posibilidad de una *nueva orientación,* completamente distinta a las hasta ahora habidas, en el sentido de tomar las raíces como soporte biológico en donde, de modo pasivo, neoformar la cepa caulinar apropiada, en razón de su asepsia e integridad total, así como capaz de evolucionar hacia formaciones caulinares y por tanto, también foliares, completamente normales dentro de la particular estructura de cada vegetal. De ser ello confirmado experimentalmente, «habríase contribuído a esclarecer, e incluso a normalizar, un aspecto importante dentro de la técnica *in vitro,* todavía sin resolver satisfactoriamente».

La observación que sugirió el *fundamento* de nuestro método (como casi siempre ocurre en tales casos, fortuita y ajena a las finalidades de las experiencias en curso con tales raíces) fué que en la trama radicular de ciertos cultivos aparecieran yemas con vigor y aspecto normal y comprobadas las condiciones de estos cultivos, se vió eran distintas de las generales, aunque fáciles de reproducir y obtener a voluntad. Quedaba por comprobar y observar la evolución *in vitro* de tales yemas, accidentalmente producidas sobre raíces *in vitro,* pues de desarrollar plántulas normales, cabría proceder a que tal accidente fuese racionalmente inducido y orientado hacia el logro del cultivo de tallos aislados.

Los cultivos de raíces de *Atropa Belladonna L.* en que por determinadas circunstancias no se renovó el medio nutritivo periódicamente como se venía haciendo (cada veinte días), manifiestan una disminución gradual en la intensidad de desarrollo de la cepa radicular hasta el cese de su crecimiento, aproximadamente a los quince días, adquiriendo entonces la trama radicular un tinte parduzco, y la solución del medio White I se enturbia a más de aparecer necrosis en las raíces. Estos defectos, síntomas de agotamiento de las condiciones nutritivas y espaciales, traducen como resultante una pérdida de vitalidad ; pero, *y aquí radica la transcendencia de nuestra observación,* conjuntamente a estos síntomas denótase aparecen gran número de pequeños puntos, como especies de esbozos de yemas, que van tomando

forma de nudosidades o engrosamientos, y a los veinte o treinta días adquieren ya el aspecto de verdaderas yemas. El aspecto general del cultivo es, entonces, totalmente distinto al de los otros normales, pues el líquido nutritivo, agotado como se dijo, aparece turbio y precipitado, las raíces lampiñas, por pérdida de sus pelos absorbentes, y parcialmente necrosadas (ápice pardo negruzco), así como parduzcas y endurecidas mientras que, al contrario, las nudosidades recién aparecidas lo son en gran cantidad, muéstranse muy vigorosas y blancas. (Esta última cualidad débese a haberse formado en la oscuridad.)

Las condiciones anómalas consisten, pues, en una manifiesta *deficiencia nutritiva*, por agotamiento del medio al no ser éste renovado, así como también por efectos de cierta *anaerobiosis*, consecuencia de la excesiva permanencia de la trama radicular en un mismo recipiente. Sin embargo, pese a ser posibles en la mayoría de los cultivos, poca o ninguna referencia de similares hechos se indican en la literatura, pues, como dice Nobecourt (1946), para cultivos de zanahoria, tal proceso no ha sido anteriormente consignado, ni como curiosidad siquiera, por otros autores, lo que es extraño así ocurra, dice; habida cuenta de los numerosos ensayos realizados sobre cultivo de raíces aisladas.

Siendo tal hecho el punto de partida de nuestro método propio, es de interés precisar cómo y en qué condiciones es capaz de producirse, así como la posterior evolución *in vitro* de las yemas caulinares así formadas.

A tal objeto, trasladados estos anormales cultivos a medios nuevos, es decir, colocándolos otra vez en condiciones normales; en ellos, las yemas no evolucionan, sino que muestran muy lento crecimiento, mientras que las raíces en que ellas se insertan, si la necrosis no era total y conservaban algo de su vitalidad, recobran total y rápidamente la intensidad de desarrollo, para volver a derivar así un nuevo y verdadero cultivo radicular.

Las causas responsables de la formación de yemas en los cultivos de raíces son, en nuestros cultivos por lo menos, las deficiencias nutritivas y de aerobiosis, lo que concuerda con algunos otros hechos anteriores, como los de Prevot (1939), quien atribuye la formación de yemas, en hojas de Begonia, a estados de anaerobiosis, y también con White (1939), al opinar, de modo

general, que algunos procesos de diferenciación *in vitro* pudieran ser consecuencia de un deficiente aporte de oxígeno.

Y, además, como las yemas producidas son asépticas si las condiciones deficitarias referidas, en vez de accidentales y fortuitas, son voluntariamente causadas lo que es posible por cuanto quedaron, en el caso de la belladona, claramente determinadas, quedará «*instituído un nuevo método técnico para lograr cepas caulinares adecuadas a partir de cultivos radiculares*». Concretamente, tales cepas pueden obtenerse en cultivos en los que, después de un activo crecimiento, no se renueva el medio (deficiencia nutritiva provocada) ni se cambia de recipiente (inducción de deficiente aporte oxigenado), para a los veinte o treinta días formarse gran cantidad de yemas sobre la trama radicular. Ello es tanto más favorable a medida que la edad de las raíces aumenta, es decir, como si la capacidad formativa de yemas dependiera no sólo de las dos condiciones deficitarias indicadas, sino también de la mayor o menor vejez de la raíz, hasta el extremo que este factor limita aquel proceso, al precisarse una cierta edad (dos a cuatro meses de activo crecimiento) *in vitro* de las raíces para que la producción sea eficiente.

Queda, de esta forma, determinado un nuevo método técnico para conseguir cepas caulinares a partir de raíces, a condición de que en el vegetal en cuestión sea factible el cultivo *in vitro* de éstas ; pero adviértase que el cultivo de órganos radiculares es el más factible de conseguir, con lo que el método puede generalizarse con suficiencia. Este método es, como el de Gautheret, indirecto, pero ofrece la ventaja de una más fácil manipulación, más fácil aislamiento (las raíces están en medio líquidos), y así como no se altera la evolución normal, inherente a la propia condición caulinar de cada vegetal, pues la fácil toma de las cepas a partir de las raíces respeta, sin alteración alguna, el poder de organización, la potencialidad de desarrollo, la diferenciación, etcétera, del meristemo caulinar contenido en la yema así formada.

En efecto, el desarrollo *in vitro* de tales yemas, si bien es nulo cuando permanecen adheridas a las raíces, por el contrario, una vez aisladas y sembradas como cepas caulinares, derivan una plántula de aspecto, en tamaño y configuración normal,

demostrando así la bondad de este proceder, puesto que ello es la primera vez que en la técnica *in vitro* así ocurre.

En los subsiguientes capítulos detállase las fases, tanto técnicas como de desarrollo, de los cultivos obtenidos mediante este método, demostrativos de tal aserto. Y si su fundamento es el anteriormente razonado, el *detalle operatorio* como se procede es el siguiente:

Se provoca primero las condiciones deficitarias aludidas, no renovando el medio nutritivo (White I) en cultivos de raíces de belladona de cuatro meses de edad *in vitro*, y cuando el número de yemas neoformadas es suficiente (veinte o treinta días), se traslada la trama radicular a caja Petri estéril, llena de líquido nutritivo también estéril (6), en donde esparcida convenientemente, cuidando de no lesionar especialmente las pequeñas yemas, se eligen de éstas las de mayor vitalidad y vigor para, seguidamente después, con pinzas y tijeras, aislarlas y trasladarlas rápidamente a otra caja Petri, análoga a la anterior, de donde se toman las que la seriación aconseje. Si alguna yema se manifestara muy fuertemente unida a la raíz, entonces es preferible aislarla seccionando en la zona radicular que no sobre la base propia de la yema, a fin de que el aislamiento sea totalmente inerme, pues cualquier lesión de la yema es capaz de influir su posterior desarrollo *in vitro*. Aisladas las yemas se transfieren, es decir, se siembran según técnica general, a los medios de cultivo. Si éste es sólido, se procede así: Con una espátula estéril, recién flameada, se hace una pequeña ranura o incisión en la superficie del medio, por fluidificación al estar aún algo caliente, en la que se deposita la yema debidamente orientada, y con la misma espátula se cierran los bordes de la incisión, de modo que quede como hundida en su mitad a la vez que sujetada suficientemente, a fin de conservar la posición, y, lo que es más importante, la polaridad (ápice en la parte opuesta a la superficie del medio). Si por cualquier motivo, como puede ser el de su difícil aislamiento, alguna yema llevase esbozos de raicillas o raicillas se procura, operando igual, que éstas queden introducidas en la oquedad abierta.

---

(6) Detalle manipulativo similar se expone en: Tesis Doctoral. LUNA MORENO, C. (referencia (1)).

Este método es, excepción hecha de la precisión de obtener o tener previamente el cultivo de raíces del vegetal de que se trata, por su proceder técnico y sus resultados, así como por el escaso material que precisa muy asequible y, a la vez, factible de generalizar a las muy numerosas especies vegetales cuyo cultivo de raíces está ya determinado.

IV.—Experiencias y resultados

Las distintas experiencias realizadas para estudiar, determinar, establecer e interpretar el cultivo *in vitro* de órganos caulinares particularizado a los de *Atropa Belladonna L.*, así como para fijar sus condiciones materiales, técnicas y nutritivas, se exponen ordenadas según el método técnico ensayado (White, Gautheret o método propio) respectivamente; pero por la importancia de las condiciones nutritivas, dentro de cada grupo se consideran aisladamente las seriaciones concernientes a cada medio nutritivo utilizado primero, y conjuntamente luego. En los dos primeros métodos, los medios ensayados son casi tan sólo los que originalmente dispusieron sus autores, a fin de conservar la esencia de los mismos y poder, de esta forma, ofrecer comparación con el nuestro propio. En éste se ensayan el número que fué preciso para, mediante experiencias previas, determinar el medio más óptimo en nuestras condiciones técnicas y para el vegetal cultivado en particular.

Aunque en cada experiencia los resultados se dan al final de cada método, en las seriaciones experimentales de cultivos por el método propio, dada la anterior particular finalidad, estímase más conveniente exponerlos aisladamente en cada medio nutritivo ensayado.

La descripción del desarrollo *in vitro* de los órganos caulinares se efectúa considerando los efectos producidos como concernientes a un cultivo tipo, a fin de evitar repeticiones dada la similitud de los de cada seriación; pero sin menoscabo de particularizar las excepciones que pudieran haber, y como ilustración objetiva de los hechos y observaciones que se describen, insértanse las fotografías y dibujos interpretativos de los estados que, gradualmente, adquieren las cepas en sus distintas etapas evolutivas eligiendo, como es lógico, los indispensables para dar fe y facilitar, con su observación, la comprensión del texto, pues dada su semejanza, es obvio registrar uno a uno todos los ensayos así como, una a una, todas las etapas del mismo, aparte de que otros motivos económicos y materiales, así como riesgo de infección, condicionan que sea el registro fotográfico

no excesivamente amplio. Se adjuntan, además, dibujos interpretativos para realzar y hacer más comprensibles los particulares detalles que por su interés deban considerarse en la interpretación, descripción y discusión de los hechos que se refieren.

A) *Método de White*

Utilízase tres clases de medios nutritivos: medio A de Gautheret, medio White I líquido y medio White I sólido con oligoelementos, disponiendo por ello tres seriaciones experimentales de cultivos. Las plántulas de las que se aisló el extremo caulinar, de 1 a 2 mm. de longitud, son de tres meses de edad, crecidas en tierra.

1) *Medio A de Gautheret*

La seriación comprende diez cultivos, y los extremos caulinares (2 mm. de ápice), después de hecha la disección que este método exige, son sembrados cuidando su polaridad. La temperatura fué de 26 a 27 grados C., y la luz artificial, blanca (fluorescente).

Los cultivos así originados a los seis días de su siembra muestran la aparición en la parte inferior de la cepa caulinar de una pequeña raicilla que, introduciéndose en el agar nutricio, alcanza 1 cm. de longitud aproximadamente, a los doce días, en cuyo momento se inicia, en la parte superior de la misma cepa, una hoja que evoluciona hasta alcanzar 1 cm. de longitud a los veinticinco días, siendo verde y algo crasa, esbozando cierto grado de diferenciación hasta el punto de mostrarse con peciolo, limbo y hasta una insinuación de nervio medio. Después nace una segunda hoja junto a la anterior, cuyo crecimiento continúa hasta alcanzar 1,5 cm., y subsiguientemente después, de modo análogo, aparece una tercera yema, aunque ésta es muy pequeña.

A los cuarenta días de edad, la cepa detiene su crecimiento, y el cultivo, las hojas preferentemente, manifiestan efectos cloróticos que desaparecen al añadir solución de tartrato férrico estéril (3 ó 4 gotas por cultivo). En tal estado, y después de pasar diez días más (a los cincuenta días), estos cultivos son trasladados a otro recipiente con medio nutritivo nuevo, a fin de efectuar la renovación del medio. Esta, por la particular natu-

METODO WHITE. MEDIO A DE GAUTHERET

(Fotos 1, 2, 3 y dibujos II y III)

Foto 1.—Aspecto de un cultivo a los 40 días de su siembra.

(*Original.*)

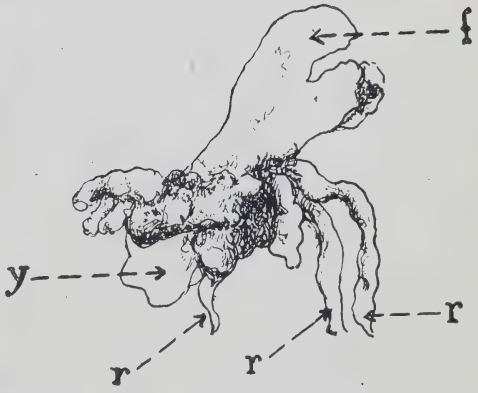


Foto 2 y dibujo II.—Aspecto de otro cultivo: *f*) hoja grande de limbo ancho; *r*) formaciones radiculares; *y*) yema situada en la parte basal de la hoja anterior.

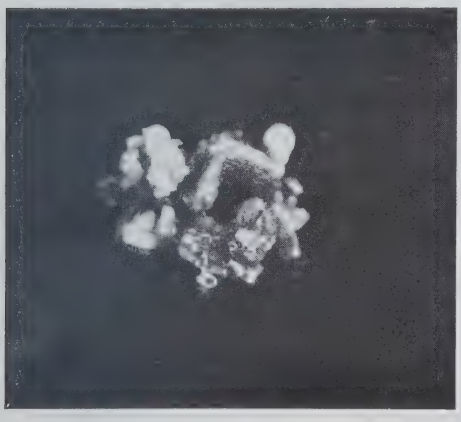
(*Original.*)

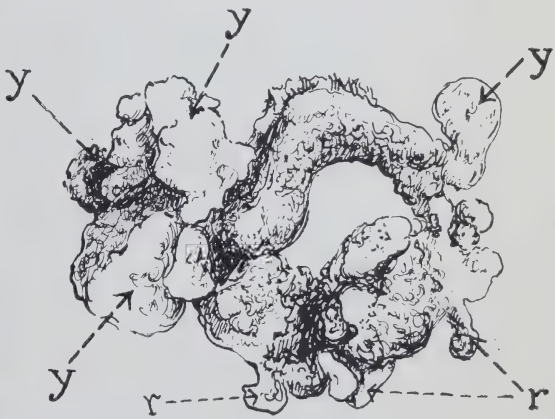
Foto 3 y dibujo III.—Aspecto de otro cultivo: *f*) hoja; *r*) raíces; *y*) yema.

(*Original.*)

METODO WHITE. MEDIO WHITE I LIQUIDO

(Foto 4 y dibujo IV)





Aspecto de un cultivo, a los 45 días de su siembra, denotando cómo de la masa indiferenciada parda, en que se ha transformado la cepa caulinar, se forman las yemas (*y*) y las raíces (*r*).

(*Original.*)

raleza de los mismos, se verifica mediante traslado de todo el cultivo, conjuntamente con la porción de agar a él adherida, cual si se tratase de un arrancamiento de toda la formación crecida. Pese a la renovación del medio, los cultivos muestran, a los sesenta días, síntomas de pérdida de vitalidad conducentes a su paralización definitiva hacia los setenta y cinco días.

Los registros de los aspectos que recogen las fotos 1, 2 y 3 y los dibujos II y III (los dibujos numeran en signos romanos la foto a que pertenecen) muestran la citada formación foliar, las yemas de su base, y, además, transcriben la similitud que en este aspecto presentan los cultivos de la misma seriación antes aludida, justificando lo innecesario de un registro total.

2) *Medio de White I líquido*

Con este medio se sembraron diez cultivos, en los cuales o bien se sujeta las cepas caulinares con lana de vidrio, adecuadamente dispuesta y hecha aséptica o bien se dejan los extremos caulinares sumergidos en el medio líquido nutritivo. La temperatura fué de 26-27°C., y la luz artificial, blanca (lámp. fluorescente).

En todo caso, con o sin lana de vidrio, las cepas muestran un estado estacionario o de latencia durante los diez primeros días para después iniciarse diminutas raicillas y yemas que confieren aspecto de masa tisular poco o nada diferenciada aunque, posteriormente, el crecimiento de las yemas continúa en poco grado hasta los treinta días mientras que, al contrario, la masa aludida engruesa más hasta transformarse en una masa amorfa con puntuaciones blanquecinas y pequeñas yemas, también de aspecto blanquecino, en algunas de las cuales (las más desarrolladas) se esbozan pequeñísimas hojas de escasa diferenciación. Subsiguientemente, a los cuarenta y cinco días, aun siendo el crecimiento lento, se aprecian tres o cuatro yemas por cultivo de hasta 0,5 cm. de tamaño, continuando la masa de la cepa con más o menos diferenciación, pero presentando ya síntomas de escasa vitalidad. Renovado el medio nutritivo, analogamente a como se ha indicado, se observa cómo continúa la disminución del crecimiento que llega a ser total, aproximadamente, a los setenta días de la siembra.

Registran estos estados descritos la foto 4 y su dibujo IV, en el cual, pese a ser cultivo de cuarenta y cinco días, tan sólo, ofrécese el aspecto más característico, mostrando cuatro yemas claramente y algunas pequeñas raicillas.

3) *Medio White I sólido adicionado de oligoelementos.*

A 10 cultivos afecta esta seriación que se realiza en análogas condiciones técnicas, térmicas y lumínicas a las anteriores.

Las cepas caulinares sembradas formaron raicillas que se introdujeron en el medio sólido adquiriendo 1 cm., aproximadamente, a los diez días y comenzando entonces un claro crecimiento, originándose un pequeño tallo verde con crecimiento en longitud bastante rápido, pues a los quince días tiene 1 cm. de de altura y, en su ápice, una pequeña hoja; a los veinticinco días es de 2 cm. de altura y la hoja manifiéstase ya claramente (0,5 cm.). Después aparecen dos nuevas hojas, en la base de la primera, a los treinta y cinco días, siendo éstas de 1 cm., con aspecto verde y, con peciolo y limbo bien patentes. Durante este tiempo se forman otras raíces que primero salen al exterior del agar para luego introducirse otra vez en él.

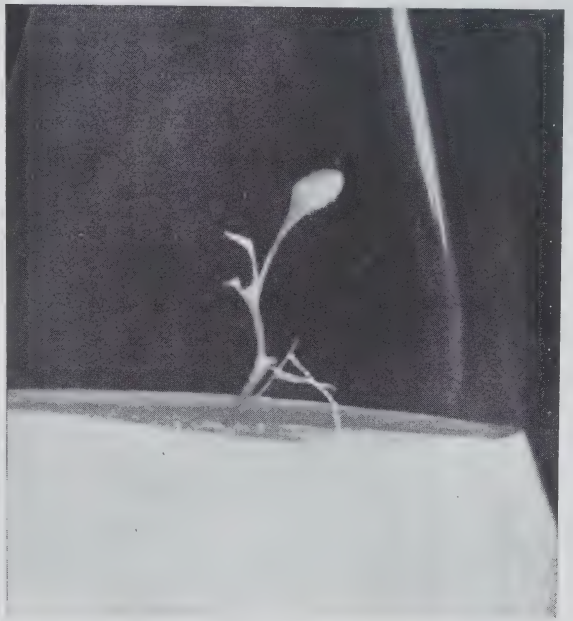
Como en casos anteriores se renueva el medio nutritivo a los cuarenta y cinco días, ocurriendo aquí que continúa creciendo el cultivo, con análoga intensidad, adquiriendo la primera hoja nacida un tamaño de 2,5 cm. (limbo = 1 cm. y peciolo de 1,5 cm.) y apareciendo un cuarto esbozo foliar.

Los resultados son más satisfactorios, en bastante grado, que en las anteriores experiencias, pues, se mantiene la vitalidad de la cepa caulinar íntegra y continuamente sin pérdida gradual alguna con la edad; podría considerarse, por tanto, como logrado por primera vez, el cultivo definitivo de órganos caulinares de Atropa Belladonna L., si no ocurriera que el porte de la plántula desarrollada no es, por lo exiguo, lo totalmente satisfactorio que en nuestro concepto, cabe exigir y desear.

Ahora bien, el mantenimiento y continuidad de la longevidad y vitalidad de crecimiento de la cepa nos permite, por primera vez en nuestras experiencias, verificar su RESIEMBRA a fin de conseguir indefinidamente la vitalidad y el ritmo pro-

METODO WHITE. MEDIO WHITE I SOLIDO, CON OLIGOLEMEN OLIGOLEMENTOS

(Fotos 5 y 6 y dibujos V y VI)



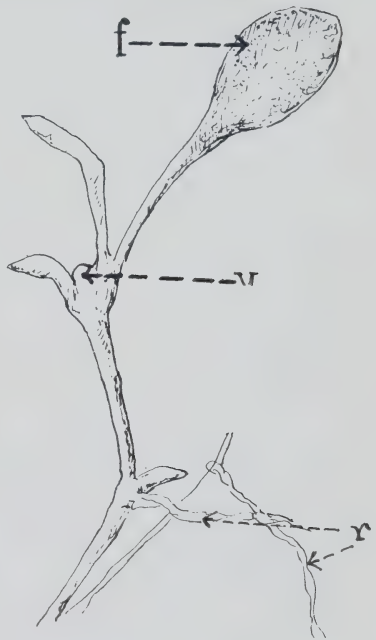


Foto 5 y dibujo V.—Aspecto de un cultivo, a los 45 días de la siembra, denotando una primera hoja grande de aspecto normal (*f*) y las otras dos de menor porte, así como el nacimiento de una yema (*y*) foliar, en la axila de la última hoja formada, y las raicillas (*r*).

(*Original.*)

Foto 6 y dibujo VI.—Aspecto de un cultivo a los 30 días de su resiembra. Obsérvese el aspecto inicial presentado y que luego derivará en una formación caulinar análoga a la de la foto 5.

(*Original.*)

liferativo del meristemo caulinar para abordar el *estado indefinido*.

Y, en consecuencia, se practica la resiembra de los cultivos seccionando la pequeña y última yema nacida (dibujo V), apenas de 2 mm., transfiriéndola a nuevo medio White I sólido con oligoelementos, pero no en recipientes de 100 c. c., sino de 250 centímetros cúbicos, según técnica general. El nuevo cultivo manifiesta a los diez días un claro crecimiento con aparición de una raícilla y esbozándose, a los 15 días, una primera hoja que crece de modo rápido, análogo al cultivo de siembra anterior, apareciendo a los veinte días también dos nuevas hojas, y así sucesivamente, hasta originarse una plántula parecida a la de los anteriores cultivos de siembra. Su vitalidad es patente, sin síntomas de clorosis ni de indiferenciación, por lo que a los cuarenta y cinco días de la resiembra se renueva el medio nutritivo y quince días después (a los sesenta días de cultivo) se efectúa la segunda resiembra, de modo análogo a la anterior, originando su desarrollo otro nuevo cultivo de características evolutivas y finales idénticas a los de siembra y primera resiembra (foto núm. 5). Igualmente ocurre si se efectúa una tercera resiembra, y así sucesivamente, hasta la quinta y última efectuada, después de la cual estimamos conseguido, por obtener siempre el mismo análogo y continuado desarrollo, el *estado indefinido* por espacio de aproximadamente unos trecientos a trescientos cincuenta días de desarrollo *in vitro*, a consecuencia de que la distancia que separó una resiembra de otra fué de cuarenta y cinco a sesenta días aproximadamente.

El aspecto de las plántulas crecidas tanto para cultivos de siembra como en los de sucesivas resiembras, presentan características similares y su desarrollo es continuado pero, sin embargo, si bien las plántulas tienen aspecto un tanto normal, no deben considerarse estos resultados satisfactorios en sentido estricto por razón del exiguo porte, ya que el posterior desarrollo apenas si supera el tamaño alcanzado a los cuarenta y cinco días (foto núm. 5 y dibujo V). Por tanto, cabe concluir que el exiguo tamaño de las plántulas limita la consecución del cultivo de tallos de belladona, tanto en su estado definitivo como indefinido.

La foto núm. 5 y el dibujo V registran el citado aspecto a

los cuarenta y cinco días de la siembra, denotando la situación de la yema que en tales plántulas se tomó como cepa de siembra, mientras la foto núm. 6 y el dibujo VI indican la primera etapa evolutiva de un cultivo provinente de resiembra, que luego, al alcanzar su máximo grado de desarrollo, presentará análogo aspecto al de la plántula recién anterior indicada (foto número 5).

A_1) *Resultados*

La observación y control del desarrollo *in vitro* de cultivos de tallos de Atropa Belladonna L., sembrados primero y resembrados después, según método de White, conducen a los siguientes hechos y consideraciones: a) *La técnica* de siembra que fundamenta el método, directa disección de meristemos caulinares a partir de plántulas crecidas en tierra, manifiéstase como buena, pero a condición de extremar los cuidados de aislamiento para evitar posibles lesiones. Y aun así haciéndolo, regístranse algunos de tales casos, así como también otros de infección accidental. b) Comprobamos de todo punto, como White y Ball, *la natural asepsia* del meristemo caulinar en la belladona dependiente de su protegida localización en la planta. c) Referente a las *condiciones nutritivas* se evidencia que el estado líquido de los medios influye desfavorablemente en el desarrollo de las cepas caulinares ya que en el medio White I líquido los resultados son menos satisfactorios, aun presentando mayor riqueza nutritiva que el medio A de Gautheret y considerablemente menos que para el White I sólido con oligoelementos. El estado líquido influye condicionando una vitalidad muy limitada y marcada indiferenciación, adquiriendo en nuestro caso los cultivos un aspecto anormal de forma y de escasa diferenciación, lentitud en su crecimiento y limitada vitalidad, por lo que no se consigue ni siquiera el estado definitivo de órganos caulinares. c) La observación de que en todos estos cultivos deficientes el desarrollo radicular era o muy escaso o nulo, induce a interpretar que la absorción es deficientemente efectuada y, por tanto, la cepa caulinar estuvo falta de nutrimentos para abastecer las distintas fases de crecimiento (embrional, extensivo, espesamiento de membrana, etc.), así como para la propia división ce-

METODO GAUTHERET. FASE DE FORMACION DE YEMAS

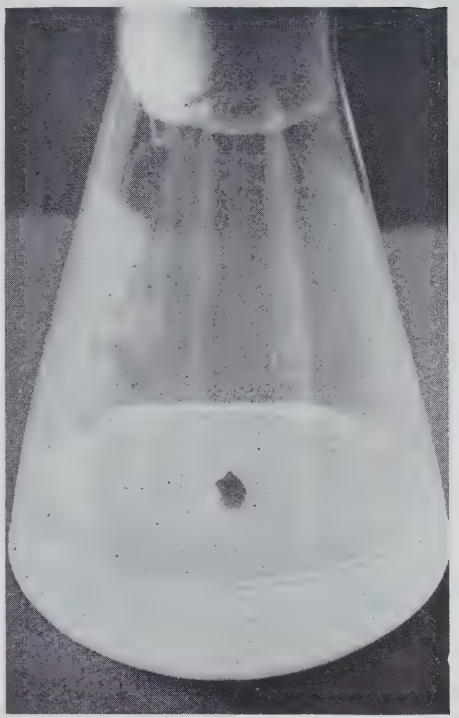


Foto 7.—Aspecto de un prisma de raíz de belladona recién sembrado.

(*Original.*)

METODO GAUTHERET. MEDIO WHITE I CON OLIGOLEMENTOS

Foto 12.—Aspecto de un cultivo, a los 35 dias de su siembra, evidenciando el poco desarrollo y diferenciación que alcanza la cepa caulinar.

(*Original.*)

METODO GAUTHERET. FASE FORMACION DE YEMAS

(Fotos 8, 9, 10, 11 y dibujos X y XI)

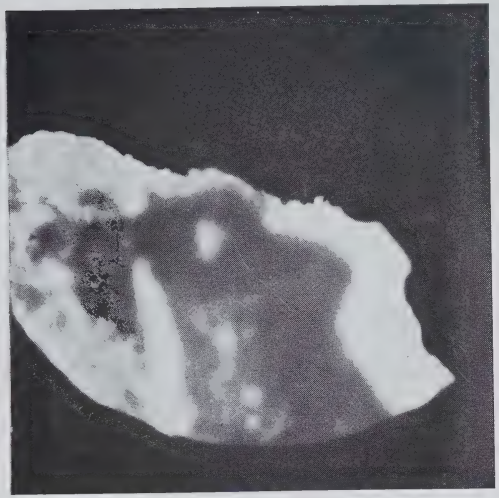


Foto 8.—Aspecto de un cultivo, a los 15 días de su siembra, manifestando tan sólo un ligero espesamiento de la cepa caulinar.

(*Original.*)

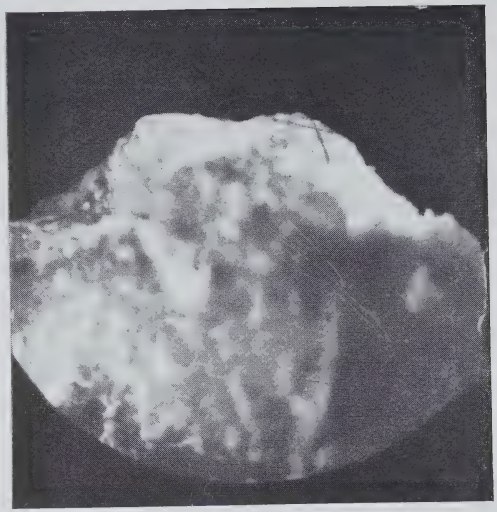


Foto 9.—Aspecto del mismo cultivo, a los 17 días, en el que se denota ya la formación del callo.

(*Original.*)

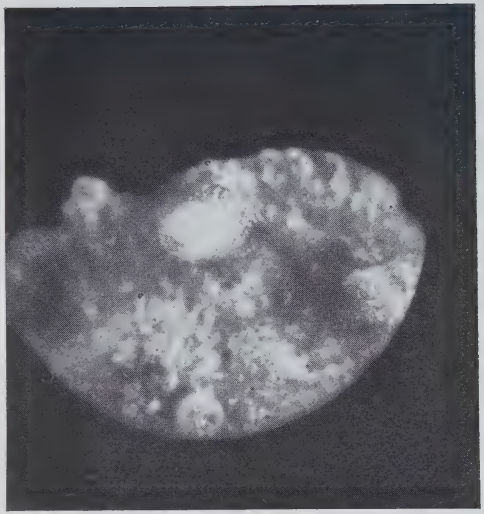


Foto **10** y dibujo X.—Aspecto del mismo cultivo, visto de frente, a los **25** días, manifestando la formación de yemas aisladas (*y*) y la aparición de pustulas (*p*).

(*Original.*)

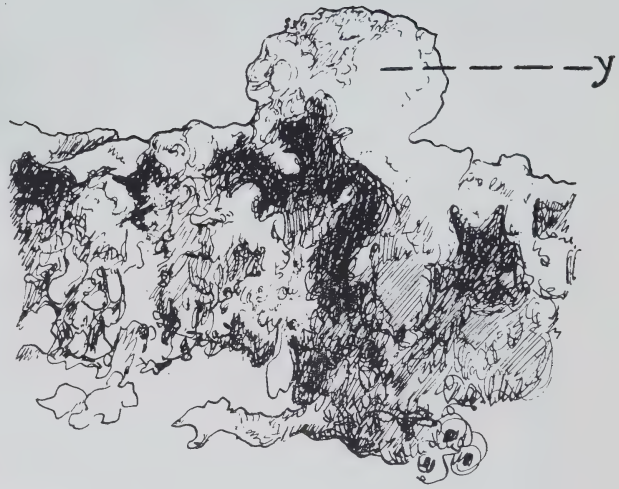


Foto 11 y dibujo XI.—Aspecto del mismo cultivo cuando ya la yema caulinar (*y*), destinada a la resiembra, alcanza el desarollo óptimo (a los 35 días).

(*Original.*)

lular. En consecuencia, evidénciase cierta incapacidad del meristemo caulinar para verificar su nutrición directamente por sí mismo. En tal sentido, los órganos radiculares son los únicos capaces de suministrar una nutrición suficiente a las zonas meristemáticas caulinares y, en consecuencia, si faltan o están poco desarrollados, limitarán la evolución, primero, y la vitalidad, después, de la cepa caulinar. e) De los medios sólidos ensayados, el más adecuado resulta el White sólido con oligoelementos, mostrándose insuficiente el A de Gautheret al motivar efectos de clorosis y vitalidad limitada de los que, si bien el primero desaparece por la adición de ciertas sustancias, el segundo impele a la cepa caulinar a una gradual, pero indefectible muerte. El medio White I adicionado de oligoelementos y solidificado con agar se manifiesta, como el primer medio ensayado por nosotros capaz de cubrir si no totalmente, sí parcialmente las condiciones y exigencias que en su nutrición expresa el meristemo caulinar, cultivado según el método de White, permitiendo cierta normal vitalidad y también sucesivas resiembras (hasta cinco).

Pero adviértese una importante limitación en la finalidad del cultivo de tallos el poco porte o tamaño de las plántulas obtenidas por cuanto alcanzan en cierta etapa de cultivo (cuarenta y cinco días) un tamaño que ya no es más que muy poco, superado y que soporta, como es lógico, un número muy escaso de formaciones foliares (3 ó 4). f) En todos los cultivos se observa, de modo casi absoluto, que el comienzo del desarrollo de las cepas caulinares coincidió con la aparición previa del aparato radicular, el cual, a su vez, se mantuvo siempre con dimensiones reducidas. Tal hecho evidencia, pues, la necesidad de estos órganos para la función de absorción de nutrientes, en el desarrollo *in vitro* de la cepa caulinar; pero ésta, al mismo tiempo, exige una limitación del mismo. Esta observación, que permite indicar que el desarrollo *in vitro* de cepas biológicas precisa de un previo enraizamiento por ser de carácter general en los ensayos y muy importante será posteriormente considerada y discutida con extensión.

B) *Método de Gautheret*

En éste, como se indicó método indirecto, partimos de análogas plantas de belladona a las indicadas, cuyas raíces presen-

taban un diámetro de 0,5 a 0,7 cm. aproximadamente, utilizando los medios nutritivos siguientes: A de Gautheret, únicamente en la fase previa, y en las otras fases, o sea en el verdadero cultivo de tallos, el mismo medio y el medio White I con oligoelementos.

La *formación de yemas* o fase previa es realizada afectando 20 cultivos en matraces erlenmeyers de 100 c. c. de capacidad y 30 c. c. de medio, en donde se colocaron las taleolas o prismas, según la forma del trozo radicular, en donde originar las yemas caulinares de siembra. Pronto advertimos que las taleolas presentaban frecuentes infecciones, bastante más que los prismas, por lo que es preferible está última forma. La temperatura, así como la luz, fueron también las mismas de la anterior experiencia (26°-27° C., luz blanca artificial).

Los prismas radiculares comienzan a proliferar activamente en las zonas cercanas a su línea generatriz, motivando un débil anillo circular engrosado, que en el caso de ser taleolas es doble, ya que aparece otro en la parte cercana a la corteza; a los catorce días, la parte central produce un espesamiento discontinuo con caracteres de protuberancias más o menos definidas, pero siempre aisladas, y posteriormente, a los veinte días, en el líber (parte externa del prisma) se forman pústulas independientes a la vez que en la parte inferior del prisma (cara en contacto con la superficie del medio) se originan pequeñas raícillas, emergentes de la zona cambiógena, evolucionando la cepa de modo que a los treinta días manifiesta esbozos de yemas, que alcanzan estado adecuado para ser sembradas, es decir, para poder utilizarse como cepas caulinares a los treinta y cinco días aproximadamente.

La anterior descripción puede observarse detalladamente en las fotos 7, 8, 9, 10 y 11 y dibujos X XI, desde el momento en que un prisma radicular es recién sembrado hasta cuando se presenta en él una yema neoformada (a los treinta y cinco días de la siembra), propia para cepa caulinar (foto 11 y dibujo XI), pasando por los estadios graduales de pequeño espesamiento (foto 8, a los trece-quince días), callo manifiesto (foto 9, a los diecisiete días), y a los veinticinco días, en registro frontal del cultivo, muéstrase la iniciación de yemas más o menos claramente sobre una masa con pustulación general (foto 10 y dibujo X).

4) *Medio A de Gautheret*

Después de la anterior fase técnica, general en todos los ensayos de este método, una vez formadas las yemas sobre trozos radiculares de belladona, cuando alcanzaron desarrollo y aspecto apropiado, a los treinta y cinco días de su siembra aproximadamente, se las aísla mediante seccionamiento para trasladarlas a matraces erlenmeyer de 100 c. c. de capacidad, con medio A de Gautheret nuevo debidamente orientadas. Los cultivos lo fueron a 26°-27° C. de temperatura y luz blanca artificial.

Los resultados obtenidos son muy deficientes, tanto para el estado definitivo como mayormente para el indefinido, pues las yemas permanecen en estado de latencia hasta los diez días de la siembra, después de cuyo tiempo comenzaron a desarrollarse, pero manifestando muy débil crecimiento además, por breve tiempo, paralizándose a los veinte días en que sobreviene la muerte de la cepa biológica.

5) *Medio White I sólido con oligoelementos*

De análoga forma al anterior se procedió con 10 cultivos, apreciándose los siguientes hechos: la yema sembrada a los quince días, después de haber estado dicho tiempo en estado latente, comienza su desarrollo mediante formación en la parte inferior de pequeñas raíces y, también, aunque más lentamente, hay crecimiento de la propia cepa, esbozándose una pequeña expansión de naturaleza foliar, aunque sin diferenciación ostensible y algo clorótica, continuando el mismo, pero siempre con lento ritmo para motivar a los veinticinco días la aparición de otra segunda expansión foliar, análoga a la anterior, con lo que el cultivo muéstrase, en general, como una masa amorfa, con algunas expansiones foliares indiferenciadas y un tanto anormales. Después la cepa, manteniendo su vitalidad, todavía por espacio de veinte días más, lo hace sin crecimiento alguno, incluso a pesar de renovarle el medio nutritivo a los veinticinco días.

Por mantener los cultivos la vitalidad, aun después de los veinticinco días en que se paralizó el crecimiento, puede ser realizada la resiembra tomando como cepa una pequeña porción de una de sus expansiones foliares que se traslada a nuevo reci-

piente con medio, originándose cultivos de crecimiento lento, cuyo desarrollo, tanto inicial como intermedio y final, fué análogo a los recién antes descritos para los cultivos de siembra. Del mismo modo ocurre en las sucesivas resiembras, tres más, acaeciendo siempre la parada de desarrollo, al igual que en los cultivos de siembra, a los treinta y cinco días y su muerte total a los sesenta.

B_1) *Resultados*

El método de Gautheret, tal como fué ensayado, permite denotar algunos hechos y observaciones, tales como a), *la fase técnica previa,* formación de yemas caulinares sobre raíces, da mejor resulado con prismas que con taleolas, debido a que aquéllas están ya desprovistas de las partes corticales de la raíz, las cuales son de difícil asepsia siempre ; b), *la nutrición* de las cepas caulinares obtenidas según este método, demuestra que el medio A de Gautheret resulta satisfactorio tan sólo en la fase previa del mismo, pero es insuficiente para el cultivo *in vitro* de tales yemas, pues los cultivos en él sólo mantienen la vitalidad veinte a veinticinco días, no permitiendo ni el estado definitivo ni, mucho menos, el indefinido, por cuanto no es dable siquiera verificar ninguna resiembra. Tal medio expresa, pues, condiciones nutritivas deficitarias por su pobreza nutriente para el cultivo caulinar *in vitro*. En cambio, al medio White I sólido y adicionado de oligoelementos le corresponde mejores efectos, por lo que debe considerársele como aporte nutritivo más satisfactorio, aunque los resultados sean también muy deficientes y parciales, ya que el crecimiento es lento y se origina un cultivo de aspecto enfermizo, algo clorótico y manifiestamente indiferenciado.

Respecto al estado indefinido de los cultivos, evidénciase factible el verificar sucesivas resiembras (tres realizadas), manteniendo la vitalidad de la cepa ; estos, los cultivos de resiembra, presentan la misma evolución deficiente y escasa que los cultivos de siembra (sin diferenciación y siempre limitada vitalidad a unos sesenta o sesenta y cinco días) ; por tanto, conclúyese que, mediante el método Gautheret y el aporte nutritivo White I sólido con oligoelementos, si bien es posible mantener la vitalidad cierto tiempo, no llega nunca la cepa a evolucionar

Foto 13.—Aspecto total de un cultivo de raíces, de *A. Belladonna* L. en medio White I líquido, de los que se toman como punto de partida para la formación de yemas, antes de provocar en él el estado deficitario aludido en el texto.

(*Original.*)

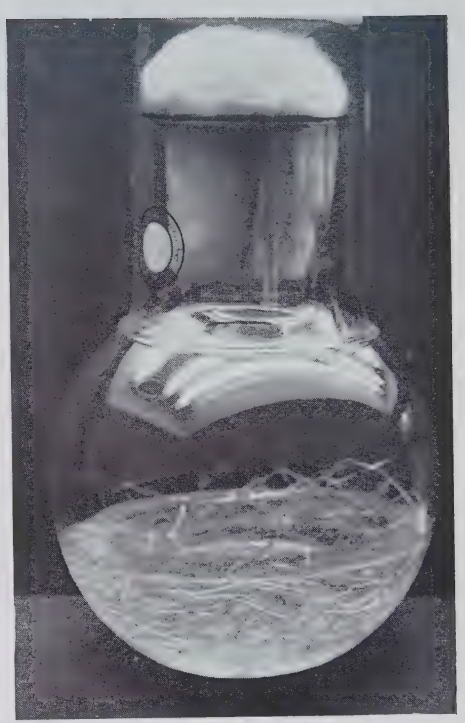
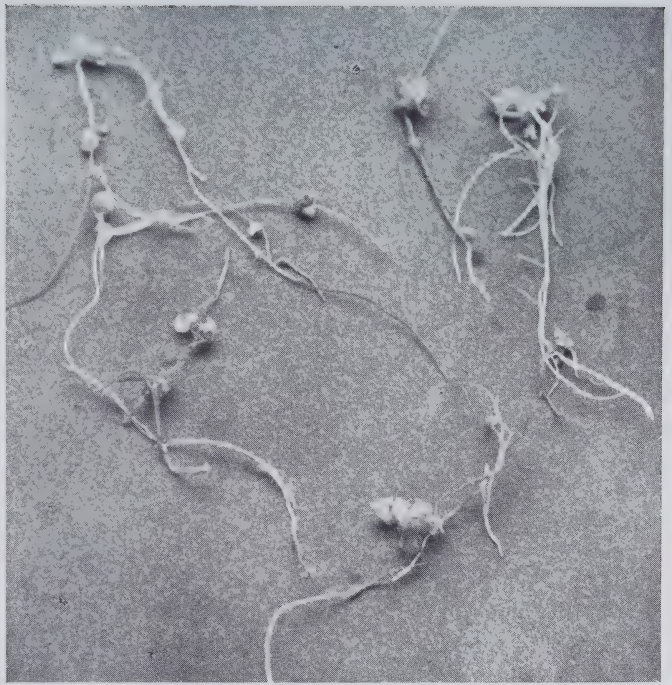


Foto 14.—El mismo cultivo en condiciones deficitarias (nutritivas y de aerobiosis) denotando un enturbiamiento y empardecimiento del líquido nutricio y de la trama radicular, respectivamente.

(*Original.*)



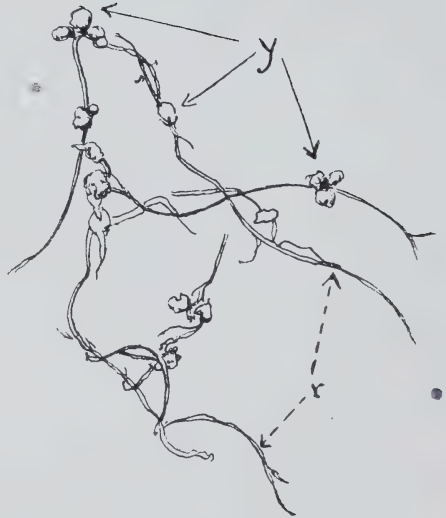


Foto 15 y dibujo XV.—Detalle del aspecto que ofrecen distintos fragmentos de raíces de un cultivo, en medio White I, mantenido en condiciones deficitarias. Denótese la claridad con que aparecen las yemas (*y*) sobre tales raíces (*r*).

(*Original.*)

dando el estado definitivo ni el propio indefinido, por lo que poco o ningún avance proporciona.

C) *Método propio*

El método propio es indirecto por consistir, como se indicó, en la obtención previa de yemas caulinares asépticas en raíces cultivadas *in vitro,* aislamiento posterior de ellas y subsiguiente siembra. Estas yemas constituyeron las cepas biológicas caulinares más óptimas, para a partir de ellas derivar formaciones caulinares y foliares en su desarrollo *in vitro.*

Los medios ensayados fueron: a) A de Gautheret. b) White I sólido. c) White I sólido con oligoelementos. d) A de Gautheret con ácido β-indol acético. e) White I sólido con ácido β-indol acético. f) White I sólido con oligoelementos y ácido β-indol acético. g) White I sólido con vitaminas B_1 y B_6.

El ensayar todos estos medios permite además estudiar e incluso determinar, más o menos concretamente, pues siempre lo es sólo en nuestro caso particular (belladona) las influencias que en el desarrollo *in vitro* de tallos ejercen las sustancias que se adicionaron sucesivamente (oligoelementos, ácido β-indol acético, vitaminas B_1 y B_6) como elementos nutritivos.

Como apéndice, y con finalidad informativa tan sólo, por ser negativos los resultados obtenidos, inclúyese una breve referencia sobre los ensayos realizados en la oscuridad.

6) *Medio A de Gautheret*

Consta este ensayo de 10 cultivos, en condiciones materiales, nutritivas, técnicas y físicas idénticas a las anteriores, habiéndose sembrado yemas caulinares de 3 mm. de longitud provinentes de raíces *in vitro* de belladona algunas, por las razones expuestas en la parte técnica para su aislamiento, con una pequeña raícilla.

La obtención de las yemas es realizada, según técnica consignada, al igual que en todo el resto de las experiencias, a partir de raíces *in vitro* de Atropa Belladonna L. crecidas en medio White I líquido, en la oscuridad, a 26°-27° C. de temperatura y en estado deficitario adecuado (fotos 13, 14 y 15, dibujo XV) para producir la formación de yemas sobre las mismas.

El desarrollo *in vitro* de estas yemas en medio A de Gautheret denota un pequeño crecimiento hacia los seis a diez días, alargándose la raícilla y apareciendo además una hoja no verde (como clorótica), pero de estructura algo diferenciada, que alcanza 0,7 cm. en el momento de la renovación del medio realizada a los veinticinco días, ya que entonces se paraliza el crecimiento, y a los treinta días aparecen efectos de clorosis; efectos que pueden desaparecer por adición de unas gotas de tartrato férrico estéril reapareciendo otra vez, a los cuarenta días incluso, si se procede a otra renovación del medio, y a los sesenta y cinco-setenta días la cepa pierde su vitalidad. Es, pues, muy limitada la vida del cultivo caulinar.

Por tanto, el medio A de Gautheret es *insuficiente* para satisfacer las condiciones nutritivas que los meristemos caulinares precisan para mantener su funcionalismo normal *in vitro* debido a su pobreza en nutrimentos y además el crecimiento es siempre muy lento, así como limitado, por lo que *no se consigue ni el estado definitivo ni el indefinido.*

7) *Medio White I sólido*

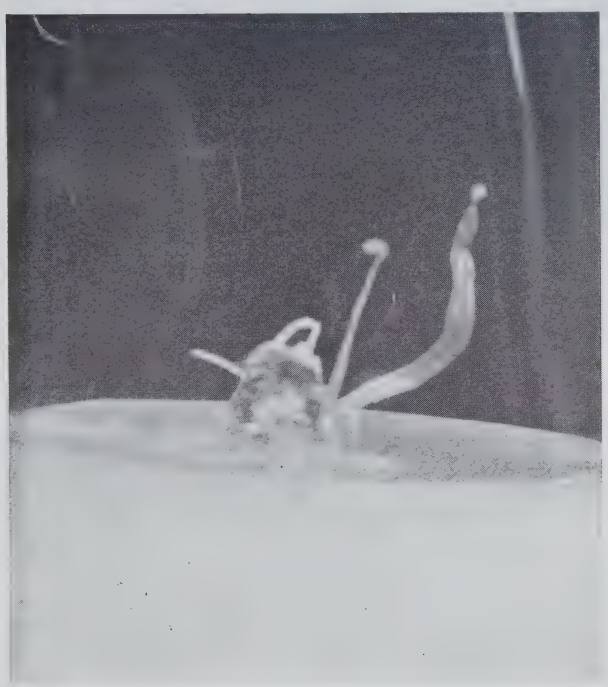
Se procedió a efectuar 10 cultivos tomando como cepas caulinares yemas, de cultivos *in vitro* de raíces, de ± 3 mm. provistas de una diminuta raicilla. A los diez días dicha raicilla aparece de unos 5 mm. de longitud, penetrando en el agar, y después, a los veinte días, la cepa entra en claro desarrollo, mostrando un engrosamiento y varios esbozos foliares un tanto indiferenciados, que a los veinticinco días, se transforman en hojas de forma especial, como expansiones laminares de largo peciolo. Estas hojas, en número variable, según el cultivo (así el de la foto 12 muestra 3 y el de la 13 muestra 5), a los treinta días adquieren un tamaño de 1 cm. de longitud con el limbo algo más ensanchado que al principio, siendo del todo verdes. A los cuarenta días la vitalidad es manifiesta y las hojas alcanzan 2 cm. de longitud a la vez que se forman mayor número de las mismas en la parte central de la masa caulinar, la cual engruesa grandemente. Estas hojas no son nunca del todo normales, sino que muestran aspecto anormal, con un peciolo largo y engrosado, y un limbo muy pequeño, poco extendido y grueso.

METODO PROPIO. MEDIO WHITE I SOLIDO

(Fotos 16 y 17 y dibujo XVII)

Foto 16.—Aspecto de un cultivo. a los 45 días de la siembra, mostrando cinco expansiones foliares poco diferenciadas.

(*Original.*)



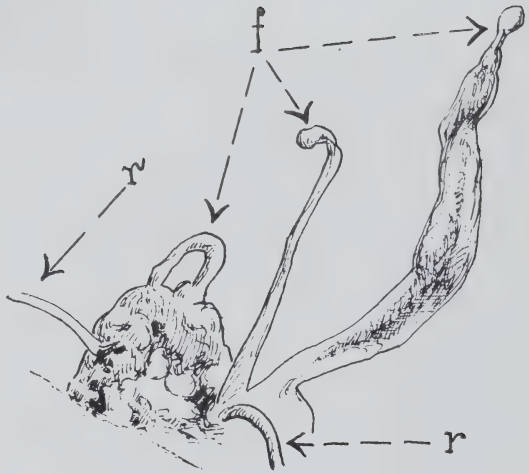


Foto 17 y dibujo XVII.—Aspecto de un cultivo, a los 45 días de su siembra también, pero mostrando, tan sólo, tres formaciones foliares poco diferenciadas (*f*) y una raíz (*r*).

(*Original.*)

La renovación del medio nutritivo se efectúa a los cuarenta y cinco días y la resiembra unos días después, trasladando a un medio nutritivo nuevo una de las yemas neoformadas, originándose otro cultivo que presenta un desarrollo «*in vitro*» análogo a los anteriores y cuyo aspecto, a los cuarenta y cinco días, es idéntico, precisando también la renovación del líquido, así como proceder subsiguientemente a otra resiembra con también idénticos resultados y, así sucesivamente hasta haber realizado 5 resiembras en que se dió por terminada la experiencia (el ciclo experimental en nuestro caso, siembra y 5 resiembras, fué pues de unos trescientos días aproximadamente «*in vitro*».

En consecuencia, el Medio White I sólido, se manifiesta en el método propio como *parcialmente apto* para el crecimiento de los meristemos caulinares de *Atropa Belladonna L.*, por originar desarrollos de gran vitalidad, pero deficientes, en diferenciación de las formaciones caulinares cuyas hojas ofrecen un aspecto poco normal, peciolo muy largo y engrosado junto con limbo muy pequeño y grueso. En otro aspecto se evidencia la precisión de que se produzca, previamente, un activo y vigoroso aparato radicular, pues el activo crecimiento de la cepa caulinar sobreviene después de haberse formado aquél y, por tanto, contribuye a ofrecer nuevos datos a favor de la incapacidad de absorción directa de los órganos caulinares.

Las resiembras sucesivas son realizadas, sin pérdida de vitalidad ni de ritmo proliferativo en la cepa caulinar, pero los cultivos resembrados motivan desarrollos análogos a los cultivos de siembra, sin alcanzarse nunca la consecución «*in vitro*» de formaciones caulinares y foliares de características similares a las normales, por lo que cabe considerar como insuficiente y poco satisfactorio los resultados de esta experiencia. Las fotos 16 y 17 y dibujo XVII muestran gráfica y claramente los efectos evolutivos transcritos.

Teniendo presente los todavía más deficientes resultados que con el mismo medio nutritivo se obtienen en los otros dos métodos (White y Gautheret) se comienza a evidenciar las ventajas del nuestro propio, para el caso particular de la *Atropa Belladonna L.*; ventajas que, como se tratará posteriormente, deben ser las responsables de que hayamos podido conseguir, en cuanto se determinaron las condiciones nutritivas óptimas, el verdadero y total cultivo «*in vitro*» de tales órganos caulinares.

8) *Medio White I sólido con oligoelementos*

Las yemas asépticas obtenidas en los cultivos radiculares de *Atropa Belladonna L.*, lo fueron de ± 3 mm., algunas con una pequeña raicilla y para establecer diferencias se exponen dos seriaciones de cultivos de 10 cepas cada una, según que las yemas caulinares lo fueran con raicilla inicial o sin ella, a fin de determinar si ello era o no de trascendencia.

a) *Cepas caulinares con raicilla*

Estas cepas son yemas caulinares de ± 3 mm. con una diminuta raicilla de 5 mm. de longitud que se introduce al sembrar en el agar.

Los cultivos presentan, a los diez días, un claro crecimiento alcanzando tamaños entre 3 y 1 cm., en forma de un vástago caulinar con dos hojitas, siendo a los veinte días su crecimiento muy ostensible alcanzando 6 cm. con la aparición de dos nuevas hojas, de 5 mm. cada una, mostrándose el cultivo como una plántula en miniatura, pero verde totalmente. A los treinta días la primera hoja que nació aparece carnosa, de forma poco normal (bordes revueltos hacia adentro), y con los extremos como amoratados, siendo de 1 cm. de larga y 0,5 cm. de ancha. Unos 0,5 cm. más hacia la base del tallo que el punto de inserción de la anterior hoja nacen las tres hojas, ya aludidas, de forma bastante normal, peciolo largo, verdes y nervios patentes, con tamaño gigante entre 1,5 a 0,6 cm. mientras que, por el contrario, la primera anterior hoja queda como atrofiada o abortada. El crecimiento continua con intensidad y, a los cuarenta días de su siembra, alcanzan casi la parte superior del matraz (foto 19), siendo el número de hojas de 4 a 6 y de unos 2 cm.. Entonces se realiza la primera resiembra, eligiendo la yema caulinar más joven de tales plántulas, evolucionando la cepa resembrada de idéntico modo e igual intensidad para, a los cuarenta días de su resiembra, adquirir a su vez análogo aspecto al de los cultivos de siembra, obteniéndose similares plantas. El número de resiembras fueron 5, afectando un ciclo de desarrollo «*in vitro*» entre siembra y 5 resiembras de trescientos días aproximadamente; luego el ritmo proliferativo alcanzó una continuación

METODO PROPIO. MEDIO WHITE I SOLIDO CON OLIGOLEME OLIGOLEMENTOS (YEMA CON RAICILLA)

(Fotos 18 y 19 y dibujos XVIII y XIX)

Foto 18 y dibujo XVIII.—Aspecto de un cultivo, a los 15 días de su siembra, mostrando una primera hoja anormal (*fa*) y dos hojas pequeñas normales (*f*).

(*Original.*)

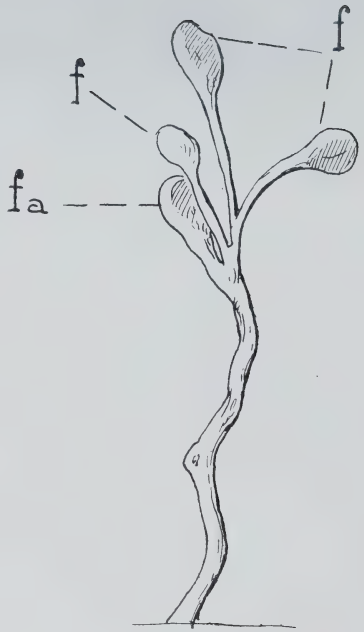


Foto 19 y dibujo XIX.—Aspecto del anterior cultivo, a los 45 días de la siembra, denotando su mayor porte, la aparición de nuevas hojas normales (*f*) y la regresión, en tamaño, de la hoja anormal (*fa*).

(*Original.*)

de unos trescientos días, sin interrupción, lo que se estima ya suficiente y no verifica la sexta resiembra.

De trascendencia, por el interés que puede derivar, es la observación de que en tales cultivos las raíces no crecieron en absoluto o lo hicieron muy deficientemente.

Las fotos números 18 y 19 y los dibujos XVIII y XIX muestran los hechos y aspectos transcritos y además evidencian que, pese a la continuación de la vitalidad y ritmo proliferativo de forma indefinida, el aspecto final o definitivo, máximo porte alcanzado por las cepas, es el de una plántula (foto 19 y dibujo XIX) un tanto distinta a la crecida en tierra por lo que estos resultados cabe considerarlos todavía como bastantes deficientes en cuanto al estado definitivo, y quizá ello se deba al escaso o nulo crecimiento del aparato radicular, hecho un tanto curioso ya que tales cepas presentaban inicialmente al ser sembradas un esbozo del mismo (raicilla de 5 mm.).

b) *Cepas caulinares sin raicilla*

Con yemas caulinares (± 3 mm) desprovistas de todo esbozo radicular, como cepas de siembra, procédese a realizar una seriación de 10 cultivos en medio White I sólido con oligoelementos. Los cultivos a los diez días evidencian la aparición de una raíz vigorosa que, al poco tiempo, alcanza 1 cm. de tamaño, en cuyo preciso momento se inicia un claro crecimiento en la cepa biológica que, a los quince días, muestra un vástago de 2 cm. de longitud, terminado con una hojita de unos 2 cm., y a los diecisiete días nace otra segunda yema caulinar que origina, con rapidez, un tallo de 0,5 cm. Ese nuevo tallo, a los veinte días, mide 2 cm. de longitud, mostrando en su extremo una hojita verde, mientras que el otro tallo, el primeramente nacido, deviene amarillo con extremos morados, y al mismo tiempo se observa que la raíz, que tan pronta y vigorosamente se formó, ya no crece nada, aunque se mantiene en todo su vigor. Posteriormente, a los treinta días aproximadamente el primer vástago nacido pierde su vitalidad del todo, adquiriendo el aspecto de masa amarilla y muerta; pero el segundo permanece verde y con rápido crecimiento, adquiriendo un tamaño de 3 cm. con 3, 4 ó 5 hojas, según los cultivos, en su ápice; hojas que son morfológicamen-

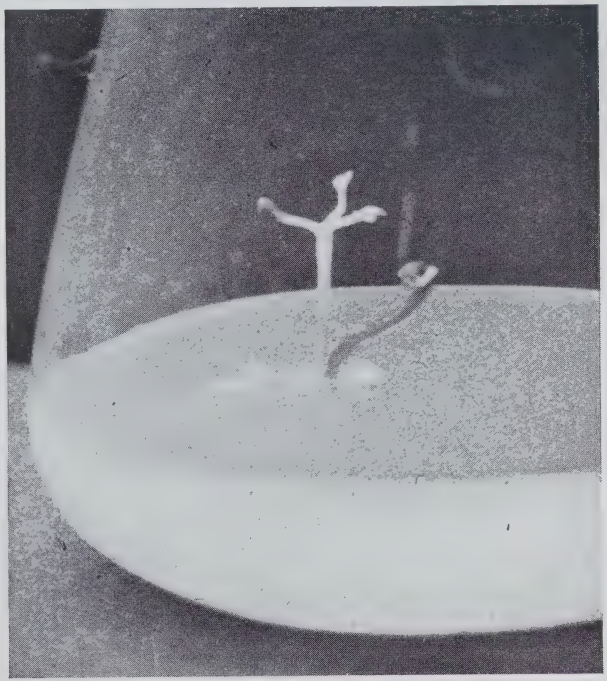
UNIVERSITY OF ILLINOIS
LIBRARY

te normales al presentarse con limbo y peciolo manifiesto y tamaño de 1 a 0,5cm. El crecimiento continúa de forma normal y rápida, pues a los cuarenta días fórmase mayor número de hojas, de 6 a 7, de las cuales dos de ellas son de 2,5 cm. de tamaño y de color verde, teniendo el tallo una altura de 4 cm., y como el crecimiento sigue continuamente a los cuarenta y cinco días se procede a renovar el medio trasladando la plántula a otro matraz de mayor capacidad (250 c. c.) con medio nutritivo nuevo. Después de la renovación aumenta el número de hojas, de 8 a 10, y al mismo tiempo aparece en la parte basal de la cepa un esbozo caulinar que origina otro tercer tallito (foto núm. 21), que luego forma hojitas de 1 cm y de 0,2 cm., respctivamente. A los cincuenta días fórmanse nuevas hojas en el tallo mayor, siendo las mayores hasta de 3 cm. de largo y 1 cm. de ancho, y en el nuevo tallo aparecen ya de 3 a 4 hojitas. Con todo ello el aspecto del cultivo es el de una verdadera planta normal, totalmente verde y con disposición caulinar muy similar a las de tierra, aspecto que a los sesenta y cinco días aun se hace más similar en razón a que se definen mejor todas y cada una de las formaciones caulinares aparecidas, aunque exhiban un porte menor, como es lógico suponer por ser crecidas *in vitro,* al de las crecidas en tierra, pero siempre es muy superior a las de los anteriores ensayos.

El aspecto de las plántulas es el siguiente (foto 21 y dibujo XXI): constan de una formación caulinar rudimentaria correspondiente al primer tallo nacido y que después se atrofia hasta perder su vitalidad (*fa*); a su lado existe un vástago caulinar o tallo principal, de 6 a 8 cm. de altura y un espesor de 1 a 2 mm. aproximadamente, con un número de hojas de 8 a 11 (*f*), verdes, con peciolo y limbo, de aspecto normal y de dimensiones de 2 a 2,5 cm. algunas, y un tercer tallo (*t*) de unos 2 cm. de altura, con 3, 4 ó 5 hojas, apareciendo en algunos cultivos todavía un cuarto tallo con 2 ó 3 hojas y altura de 1 cm. Como prosigue el crecimiento hay necesidad de realizar el traslado del cultivo, a los setenta días, a otro matraz mayor de 350 centímetros cúbicos, lo que, como es comprensible, ofrece cierta dificultad; pero, sin embargo, puédese realizar, la mayoría de las veces, sin accidente alguno observando que, si bien la vitalidad se mantiene y continúa, el aumento de tamaño no es ostensible, y en consecuencia el aspecto es siempre muy similar al

METODO PROPIO. MEDIO WHITE I SOLIDO CON OLIGOLEMEN OLIGOLEMENTOS (YEMA SIN RAICILLA)

(Fotos 20 y 21 y dibujos XX y XXI)



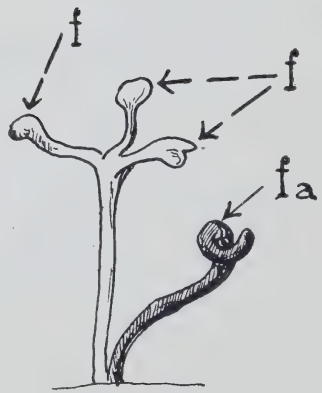
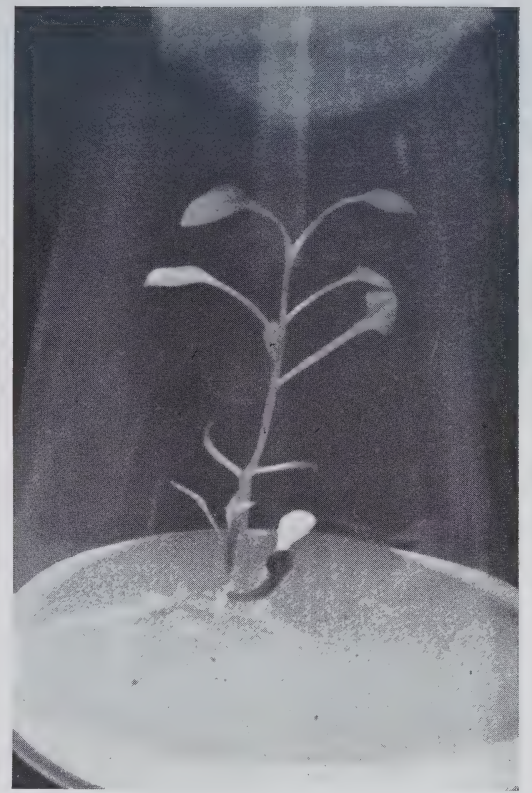


Foto 20 y dibujo XX.—Aspecto de un cultivo, a los 30 días de su siembra, manifestando la inicial formación de tres formaciones foliares (*f*) así como la caulinar anormal (*fa*) destinada a atrofiarse.

(*Original.*)



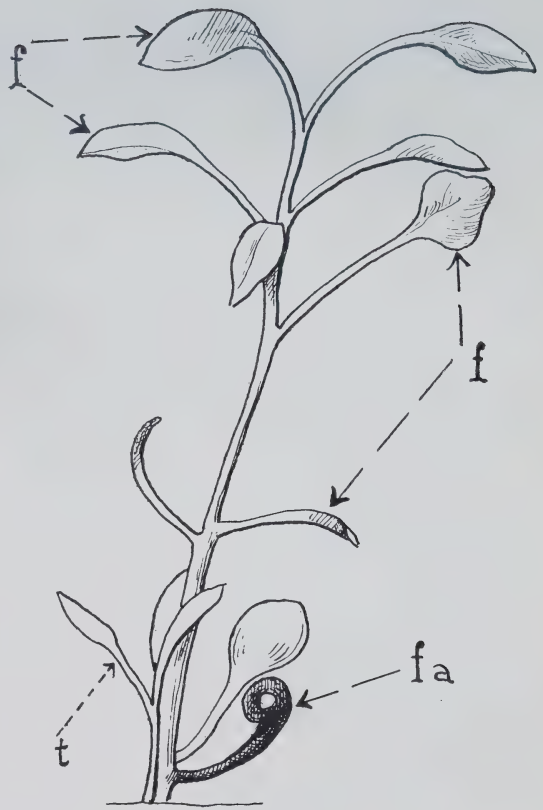
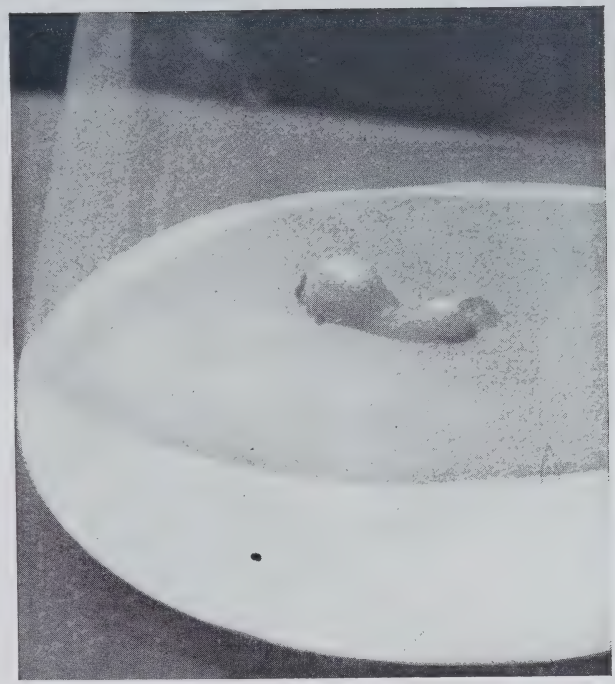


Foto 21 y dibujo XXI.—El mismo cultivo, a los 60 días de la siembra, manifestando su aspecto, por las form ciones caulinares originadas. de plantula normal totalmente, con varias hojas (*f*) y, en su base, el vástago anormal (*fa*) primeramente formado, en estado casi total de atrofia. Este es el estado definitivo satisfactorio del cultivo «in vitro» de tallos de *A. Belladonna* L.

(*Original.*)



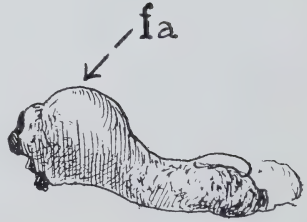


Foto 22 y dibujo XXII.—Aspecto de un cultivo, derivado a partir de uno de los anteriores de siembra (foto 21) (método propio, medio White I con oligoelementos, cepa sin raicilla), a los 20 días de su siembra manifestando, ostensiblemente, el aspecto de la masa indiferenciada que primeramente aparece y que es denominada formación de adaptación o de tránsito. (*Original.*)

Foto 23 y dibujo XXIII.—Aspecto del mismo anterior cultivo, a los 65 días de su resiembra, mostrando la regresión, en crecimiento, de la formación de tránsito (*fa*) y la brotación copiosa, sobre la misma, de varias formaciones caulinares ya normales (*f*) en sus estados iniciales de formación.

(*Original.*)

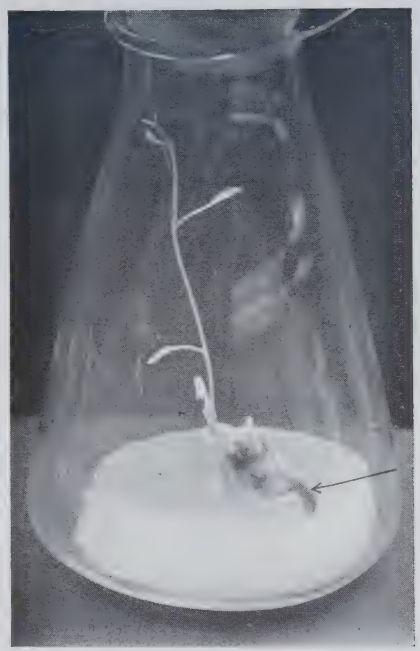


Foto 24.—Posterior aspecto adquirido por un cultivo de resiembra, análogo a los anteriores (foto 23), mostrando una especial elongación de su tallo por excesivo mantenimiento en la oscuridad (nótese la casi total regresión de la formación anormal de tránsito).

(*Original.*)

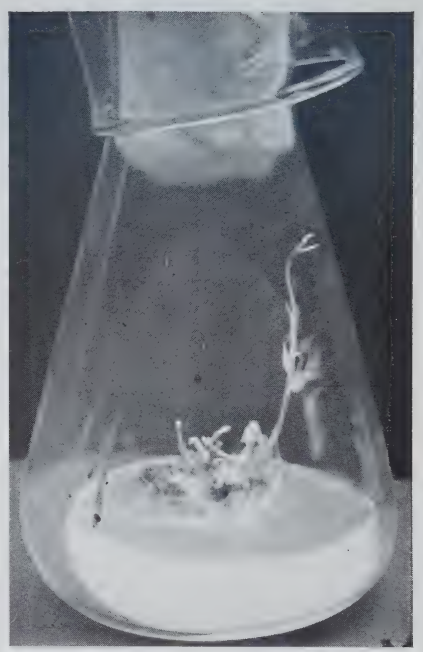


Foto 25.—Aspecto de otro de los cultivos de resiembra, análogo al anterior, mostrando una copiosa brotación sobre la formación de tránsito totalmente atrofiada, así como la aparición de un vástago en estado de mayor crecimiento que los demás. Este cultivo evidencia, además los efectos de no haber renovado el medio sistemáticamente, como en otros cultivos, por la flacidez de algunas formaciones foliares.

(*Original.*)

descrito y gráficamente expresado por la foto núm. 21 y dibujo XXI.

La RESIEMBRA de dichos cultivos se realiza a los cuarenta días, mediante el aislamiento de una yema de tales plántulas, evidenciando los cultivos de resiembra un final estado definitivo análogo al de los de siembra, ya que vuelve a reproducirse plántulas, cual la descrita. Se realizaron hasta cinco resiembras con un tiempo de trescientos-trescientos cincuenta días aproximadamente, considerando como suficiente, como se indicó en anteriores ensayos y obteniéndose siempre un estado definitivo satisfactorio (plántulas análogas a las normales), así como el indefinido, pues el ritmo proliferativo se mantiene sin disminución por espacio de cinco resiembras sucesivas.

Las fotos 20, 21 y los dibujos XX y XXI muestran dos etapas del citado desarrollo, una a los treinta días de su siembra y otra a los sesenta, en el cual puede observarse en el tallo más desarrollado el aspecto de plántula normal descrita, así como los dos accesorios tallos, en su parte basal, uno ya atrofiado (*fa*) y otro recién formado (*t*).

Siendo la resiembra condición precisa y primordial para la finalidad del estado indefinido, aspecto este que se ofrece hasta ahora muy poco aclarado y confuso, estímase conveniente detallar paso a paso la evolución en ellas de las cepas biológicas, ya que además los estados intermedios de los cultivos resembrados hasta producir el final aspecto expresado, son distintos a los consignados como propios para las cepas de siembra aun en el mismo método y medio.

De plántulas originadas mediante siembra *in vitro* se aísla y resiembra una yema de ± 1,5 mm. de tamaño aproximadamente, exenta de raíces, según técnica general, y a los diez días comienza a mostrar un activo crecimiento, que hace aumentar el tamaño de la cepa hasta 1 cm., pero sin manifestarse ninguna formación deferenciada sino, al contrario, aparece en forma de expansión laminar más o menos curvada, carnosa y sin diferenciación aparente alguna (foto 22) ; a los veinte días fórmase en su extremo un esbozo caulinar ; la expansión en sí alcanza 2 cm. y aparece el órgano radicular para, posteriormente, a los veinticinco días, formarse otro segundo tallito verde de 0,5 cm. con una pequeña hojita de 1 mm, mientras la masa carnosa va adquiriendo tona-

lidad parduzca hacia los treinta días, siempre indiferenciada así como va perdiendo su vitalidad pero, sin embargo, sobre ella se inician ya un determinado número de vástagos caulinares, de 5 a 7, lampiños y de 1 cm. de longitud alguno de ellos y de los cuales dos presentan hojitas. Estos vástagos caulinares, formados sobre la masa carnosa indiferenciada, difieren ostensiblemente de ella por su aspecto y desarrollo posterior, ya que continúan el crecimiento con gran intensidad, formando algunos a los cuarenta y cinco días 3 hojitas verdes de 2 a 3 mm., y al mismo tiempo aumenta el número de tallos originados (foto núm. 25) desde 9-10 a 15 de ellos a los sesenta días, con una altura los mayores de 2 cm. Todo ello comunica al cultivo resembrado un aspecto de pequeño e intricado bosque, aspecto que, acrecentándose a los siete días, es el siguiente: la primera formación caulinar inicial queda atrofiada como masa amarillenta, carnosa y sin diferenciación alguna, por lo que puede considerarse como anormal, pero al emitir raíces actúa entonces de soporte a sucesivas formaciones caulinares verdes, que de ella nacen en número variado según los cultivos (hasta en algunos 9 a 15), evolucionando tales vástagos mediante crecimiento rápido y normal hasta originar uno de ellos plántulas similares a la que expresa la foto núm. 21, pues siempre (fotos 24-25) suele exirtir predominio de desarrollo de algunos de ellos en detrimento de los demás, que quedan rezagados en su crecimiento.

Regístrase el primer estado en que la cepa se convierte en expansión laminar (total indiferenciación en la foto núm. 22 y dibujo XXII) a los veinte días de la resiembra, así como un estado más avanzado de la citada formación, mostrando ya su regresión así como la inicial posterior brotación caulinar a partir de ella (a los sesenta-sesenta y cinco días). Las fotos núm. 24 y 25 expresan cultivos de resiembra con la plántula, originada de uno de los vástagos caulinares que crece con predominio de los demás, mostrando la total regresión de la expansión laminar (foto 25) y la exuberante brotación sobre la misma.

Estas dos últimas fotos cumplen triple finalidad informativa, pues registran el estado de regresión de la masa indiferenciada, la brotación caulinar exuberante de la misma y además la foto 24 el efecto que en el crecimiento en longitud se produce cuando un cultivo es mantenido prolongadamente a la oscuridad,

apreciándose menor número de formaciones foliares aparecidas, así como la amplia separación de sus puntos de inserción en el tallo. Por otra parte, la foto núm. 25 registra el estado que muestra un similar cultivo cuando se prolonga, a propósito, su estancia en el mismo medio, sin renovación sistemática hasta incurrir en efectos de agotamiento en el mismo. Y en él puede, en efecto, observarse el deficiente aspecto de las formaciones foliares, pero también se evidencian la referida brotación exuberante basal. Se ha procedido así en razón de que los cultivos, sin tales dos variaciones, en las condiciones físicas (oscuridad) y nutritivas (no renovación del medio) derivan a aspectos que hubieran sido el general, o sea el que muestra la foto núm. 21.

Estos resultados con el medio nutritivo White I sólido y con oligoelementos han sido logrados sólo cuando el cultivo se efectuó mediante método propio y son de gran importancia, pues permiten determinar al citado *medio como el más idóneo para la belladona*, así como que el nuevo método propio sustenta la técnica operatoria más adecuada y factible para el cultivo de tallos *in vitro*, al conseguir que la cepa caulinar, tanto sembrada como resembrada, mantenga la vitalidad y desarrolle plántulas de aspecto similar a las crecidas en tierra, con la sola diferencia de su menor porte a consecuencia del siempre limitado espacio vital que la técnica *in vitro*, por esencia, ofrece. Y mas trascendente es también, si cabe, que tales finalidades lo sean por primera vez en la técnica *in vitro*, con total satisfacción como se consigue, puesto que el único caso que en tal sentido se consignó anteriormente, lo fué parcialmente por el menor grado logrado en el aspecto final, al ser la plántula originada de escasísimo porte y con muy pocas y exiguas formaciones foliares, como atestigua la fotocopia A (págs. 16-17).

Tales hechos permiten concluir consideraciones que pueden extenderse en general para el cultivo *in vitro* de tallos excepto, claro es, en aquellos particulares aspectos que la fisiología indique como puntos de contradicción o diferenciales según sea la distinta naturaleza del vegetal ensayado, especialmente si éste fuera en demasía particular. Y quizás aquí radique el por qué del poco porte alcanzado por las plántulas en las anteriores experiencias de Loo (Asparagus), pues él mismo indica presenta escasísimas y diminutas formaciones foliares aparte, claro es,

de ciertos detalles técnicos que debieron influir, como son el operar en tubos de ensayos y en medio líquido.

A tal efecto estímase por su interés concretar las siguientes consideraciones: 1) *Se determina el medio White I* con oligoelementos como el más favorable para el desarrollo de tallos *in vitro*, aunque esta consideración, como es de suponer, soporta la limitación propia de las particulares apetencias inferidas por la especie vegetal de que se trate. En nuestras experiencias lo es la Atropa Belladonna L. planta que, al igual que otras de su misma familia y de características similares, ofrece el más elevado interés farmacognóstico y farmacéutico, por lo que puédese con ello facilitar los estudios sobre ciertos aspectos referentes a sus alcaloides tropánicos, que hasta ahora eran puntos menos que asequibles efectuarlos sobre formaciones caulinares aisladas. 2) *Evidéncianse ventajas para el método propio* respecto a los otros dos ensayados, en razón de que en igualdad de condiciones nutritivas y materiales, únicamente con él es obtenido el estado definitivo e indefinido. Ello indica soporta una manipulación técnica adecuada, por no alterar el funcionalismo normal del meristemo caulinar representando además, por partir de yemas formadas en cultivos de raíces, una *nueva orientación* en tal sentido factible de extender a otros vegetales cuyo cultivo radicular *in vitro* sea ya un hecho, por lo que su generalización, dentro de esta técnica, ofrece amplias posibilidades. 3) Tanto cuando las cepas caulinares sembradas lo fueron con o sin raícilla, el *verdadero crecimiento no comienza hasta haberse desarrollado un aparato radicular suficiente* para la absorción de nutrimentos, condicionándose por ello un período de latencia de ocho a diez días. Por tanto, en nuestros cultivos, es precisa una previa rizogénesis que afiance la función de absorción. Estos resultados nos inclinan a considerar el meristemo caulinar como dependiente en su desarrollo *in vitro* de la aparición de la raíz como órgano de absorción y, en consecuencia, tal meristemo no será apto por sí mismo para la absorción de los nutrientes que el crecimiento le exige. Constituyen estos hechos datos coincidentes con los de De Ropp (1945), Ball (1946) y Gautheret (1940), y contradictorios con los de Went (1938), así como en ello cabe explicarse lo consignado por Loo al tomar como excepción las cepas caulinares (dos sólo), que presentaron aparato radicular y

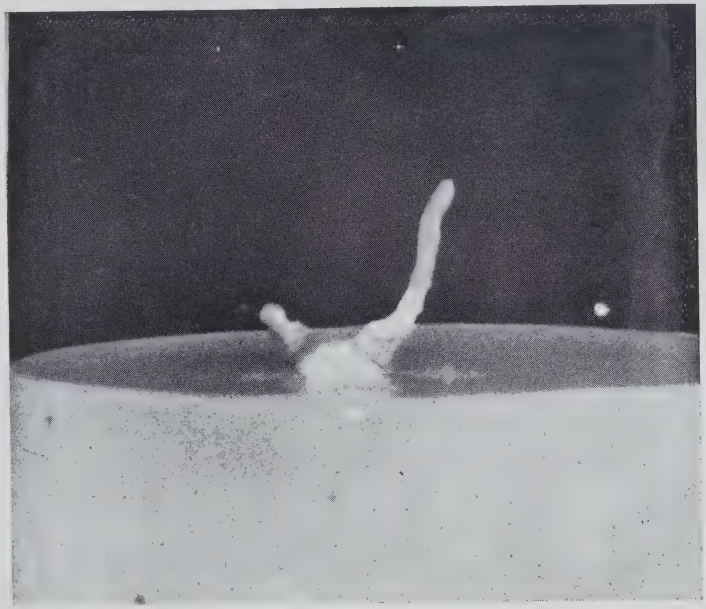
que son precisamente los que mostraban un crecimiento más rápido que el muy lento, general a todos los otros cultivos, motivador de plántulas muy exiguas. En efecto, el escaso porte podría ser consecuencia de la no aparición de órganos radiculares por cuanto ello motivaría que tales cepas no absorbieran la suficiente cantidad de elementos nutritivos que precisan para adquirir el porte normal. 4) Se observa como la primera formación caulinar, primordialmente en los cultivos de resiembra, es de aspecto anormal, cual masa indiferenciada, sin clorofila, carnosa, etc. (fotos 23 y 24) y su utilidad, según parece derívase de los datos obtenidos; sería servir de soporte y reserva nutritiva para un posterior crecimiento caulinar vigoroso, y quizás por ello manifieste un primer estado hipertrófico por acúmulo de nutrientes. Así parece acreditarlo el hecho de que originada relativamente pronto, a los diez o doce días, le atañe siempre un corto período de vitalidad (unos quince días) y que finaliza precisamente cuando aparecen las posteriores formaciones caulinares sobre ella, y a medida que estas nuevas formaciones crecen bajo signos normales, aquélla va poco a poco atrofiándose hasta adquirir un aspecto pardo negruzco y llegar a la pérdida total de la vitalidad. Esta forma hipertrófica ha aparecido en todos nuestros cultivos, aunque se evidencie más ostensiblemente en los de resiembra, formándose en los primeros estados del desarrollo, cuando aun no está el meristemo caulinar adaptado a las condiciones que le proporciona el cultivo *in vitro*, y por ello puede ser considerada como una *formación de adaptación o de tránsito* innecesaria para cuando la cepa pueda ya exhibir su funcionalismo normal, tanto en organización como en polaridad y potencialidad de desarrollo.

El por qué de su origen es todavía hipotético, aunque por las observaciones efectuadas bien pudiera deberse a influencias que sobre las zonas meristemáticas de la cepa opera la propia polaridad, la cual, aunque sólo transitoriamente, pudiera haberse alterado en el aislamiento o a que las células se encuentren sometidas a una nutrición distinta de la que de natural soportan. En el último supuesto, al ser tal formación siempre transitoria, bien pudiera preverse que se precisase un cierto tiempo para que las células adquieran otra vez una nutrición equilibrada, reparando la inadaptación que de primer intento acusaron y, como además,

la vitalidad de tal formación cesa casi en el mismo momento en que el aparato radicular comienza a funcionar normalmente, en nuestras experiencias por lo menos así ocurre, cabría admitir que *son los órganos radiculares los encargados de reintegrar el estado de nutrición equilibrada* que las cepas caulinares precisan para exhibir un funcionalismo normal. 5) El hecho cierto, del cual hacemos aquí constancia, es que el normal funcionamiento de tallos de belladona *in vitro*, precisa de una *previa formación radicular* en las cepas. 6) Se consigue plenamente, por primera vez en esta técnica, las *finalidades del cultivo «in vitro»* de tallos de belladona por método propio, en razón de que el estado definitivo final de los cultivos de siembra son plántulas de aspecto normal de 8-9 cm. a los setenta días, e igualmente las sucesivas resiembras producen cultivos capaces de adquirir el mismo aspecto final.

El número de resiembras realizadas en nuestras experiencias fué de unas cinco, con una permanencia continuada de la vitalidad y del ritmo proliferativo de cuatrocientos a cuatrocientos veinte días, con lo que se consigue plenamente el estado *indefinido* por primera vez no sólo en cuanto a la especie vegetal en cuestión se refiere, sino, como caso único, dentro de la técnica *in vitro* en general. 7) Estimamos que las causas de que nuestro método permita conservar el normal funcionalismo inherente a la cepa caulinar (organización, polaridad, potencialidad de desarrollo, etc.), es, en razón del *poco forzado aislamiento de la yema caulinar*, por cuanto ésta es fácilmente separable de las raíces en donde se forma, y, en consecuencia, sería dable de conservarse la evolución normal de las cepas. 8) Es curioso advertir que cuando las cepas caulinares se aíslan con raícilla ésta adquiere en su posterior desarrollo tamaños parecidos a los adquiridos por el aparato radicular cuando la yema no tuvo raícilla, aunque siempre fué más débil y menos extenso y, particularmente, en la seriación con White I, sólido y con oligoelementos, las yemas con raícilla inicial manifestáronse menos adecuadas como cepas caulinares que las yemas sin raícilla, puesto que motivaron un estado final de la plántula menos satisfactorio (compárense fotos 19 y 21). Ello quizá sea debido en nuestro criterio a las dificultades de adaptación que tendría el órgano radicular ya formado y que siempre serían superiores a las correspon-

METODO PROPIO. MEDIO WHITE I SOLIDO CON ACIDO β-INDOL ACETICO



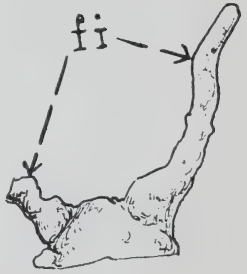


Foto 26 y dibujo XXVI.- Aspecto de un cultivo mostrando las formaciones caulinares indiferenciadas (*fi*) que se producen. (*Original.*)

dientes cuando se originan las raíces de nuevo en la cepa ya sembrada. Habla en favor de esto el que el aparato radicular, en este último caso, es siempre más robusto y vigoroso que en el anterior, aunque débese advertir que este aparato radicular consistió tanto en un caso como en otro, y de modo general en todos los ensayos así ocurre, «en una *única raíz con manifiestos y vigorosos pelos absorbentes, pero sin ramificaciones*».

9) *Medio A de Gautheret con ácido β-indol-acético*

En estos ensayos trátase en realidad, en razón de haber sido lograda ya la finalidad propuesta (estado definitivo e indefinido de tallos de belladona), de determinar la acción que pudiera ejercer el ácido β-indol acético, adicionado al medio nutritivo, sobre el desarrollo *in vitro* de tallos. Ello ofrece interés, dado la generalidad de uso y eficiencia que como elemento estimulante tiene tal sustancia.

Se realizaron 10 cultivos mediante siembra de cepas biológicas (± 2 a 3 mm.), según técnica general. En ellos preséntase el comienzo del crecimiento a los diez días con gran lentitud, sólo un aumento de 7 mm en tamaño de la cepa, siendo ésta de color blanco totalmente, pese a estar expuesta a los efectos de la luz blanca fluorescente, y su aspecto general es de masa totalmente indiferenciada. A los veinte días apréciase una yema de 0,2 mm. y otra de 0,3 mm., todas ellas blancas, mientras que la raícilla pierde su vitalidad por completo, así como el crecimiento del cultivo continúa lentísimo aún a los treinta días, manteniéndose las yemas igualmente blancas y sin diferenciación alguna y, posteriormente, si bien la cepa caulinar mantiene su vitalidad por espacio de algún tiempo más, lo hace sin crecimiento, hasta que a los cincuenta o sesenta días la pierde por completo. Los resultados indican a este sustrato nutritivo como totalmente deficiente, puesto que no consigue mantener la vitalidad de las cepas más que por un tiempo limitadísimo y en él sin o con muy débil diferenciación y además, el permanecer los cultivos blancos demuestra no haberse formado clorofila así como, por último, la muerte total de las raíces ocurre prontamente, aun en el caso de que las yemas contuvieran un esbozo de ellas en su siembra. Ratifícase así otra vez lo desfavorable, por escasez de nu-

trientes, del medio A de Gautheret, y además, que la acción propia del ácido β-indol acético está aquí muy distante de ser de estímulo en razón del escaso crecimiento habido y la indiferenciación de la cepa.

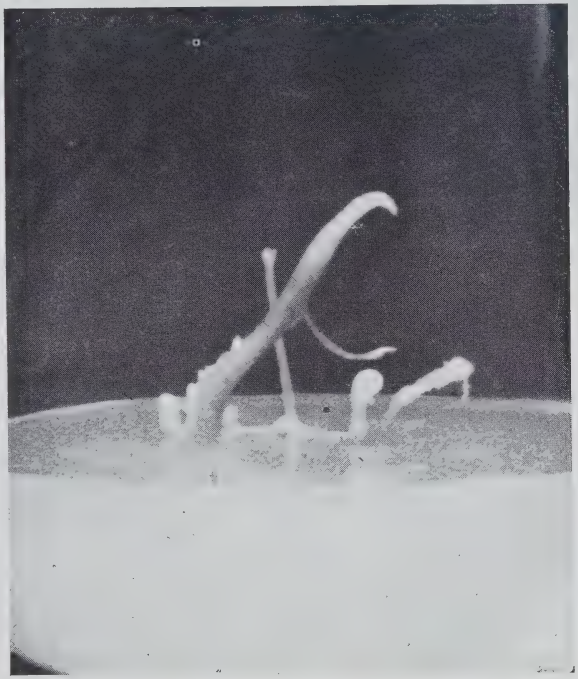
10) *Medio White I sólido con ácido β-indol acético*

Se realizan 10 cultivos sembrando yemas caulinares de ± 3 milímetros, que mostraron a los diez días dos protuberancias, y la cepa, no del todo verdosa, tiene aspecto de masa carnosa e indiferenciada observando que si la yema presenta raicilla inicial, entonces ésta pierde su vitalidad. Sin embargo, a los veinte días, el crecimiento de los tallitos nacidos de tales protuberancias es lento, pero continuado, alcanzando 0,5 y 1 cm. de longitud respectivamente, siendo de tono blanquecino, aunque ligeramente verdosos y manteniéndose el aspecto carnoso e indiferenciado. A los treinta días miden 1 cm. y 2 cm. de longitud, siendo completamente blancos excepto las puntas, algo verdes, no apareciendo formación foliar alguna.

Con estas características continúan desarrollándose los cultivos, aunque más bien mantienen su vitalidad sólo, puesto que el crecimiento es muy lento, motivando un aspecto general anormal con dos tallos carnosos, indiferenciados, blanquecinos-verdosos y sin hojas verdaderas.

Las RESIEMBRAS, a partir de la yema más diminuta, dieron cultivos de un curso evolutivo análogo al referido y también condujeron al insatisfactorio aspecto final, como queda registrado en la foto núm. 26 (cultivo a los treinta días).

Estos resultados indican existe un crecimiento más rápido y continuado que en la anterior seriación (medio A de Gautheret), por ser la vitalidad más duradera y el crecimiento más continuado, que permite la resiembra ; pero el aspecto *final o definitivo* que producen es del todo insatisfactorio por presentar una formación caulinar de escasa diferenciación, apenas contenido en clorofila y mortalidad de las raíces.



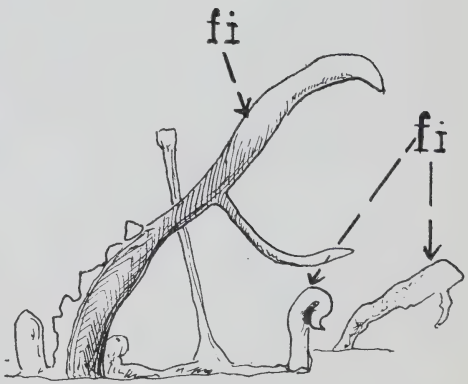


Foto 27 y dibujo XXVII.—Aspecto de un cultivo, a los 30 días de su siembra, mostrando las formaciones caulinares indiferenciadas (*fi*) a que da origen.

(*Original.*)

11) *Medio White I sólido con oligoelementos y ácido β-indol acético*

En estos de cultivos, también en número de 10, aparecen dos tallos de 0,5 cm. y 1 cm. a los diez días, de tonalidad verdoso-parduzca, indiferenciados y carnosos, con una hoja en forma de gancho curvados en su extremo, y a los veinte días nacen otros dos nuevos tallos de 0,5 cm., de análogo aspecto. Los primeros tallos crecen intensamente alcanzando una longitud de 2,5 a 1,5 centímetros, siendo uno de ellos muy grueso, pero continúan ambos con aspecto indiferenciado, carnosos y poco verdes, así como le ocurre a su hoja rudimentaria en el ápice. A los treinta días aparecen otros segundos tallos más de aspecto similar (0,5 cm. de tamaño) mostrándose el cultivo entonces como un conjunto de tallos robustos, indiferenciados, verdes parduzcos y sin hojas propiamente dichas. El cultivo, pese a mantener su crecimiento, no alcanza tamaño ostensiblemente mayor al descrito, por lo que se procede a su RESIEMBRA que, análogamente, produce cultivos con el aspecto final similar a los cultivos provinentes de las siembras.

Este medio nutritivo, que es precisamente el óptimo, según se indicó, al adicionarle ácido β-indol acético conduce a resultados muy deficientes al obtenerse cultivos con un crecimiento continuado, que permite la resiembra y mantenimiento de su vitalidad, pero mostrando formaciones caulinares con indiferenciación, poco contenido en clorofila y, además, mortalidad del aparato radicular, al igual que en el caso anterior.

Demostración gráfica de tales estados definitivos son la foto núm. 27 y el dibujo XXVII, que registran un cultivo a los treinta días.

Para establecer la acción del ácido β-*indol acético* han de considerarse conjuntamente los resultados obtenidos en las tres anteriores seriaciones experimentales para así poder atender ciertos puntos de interés: 1.° Se evidencia la *beneficiosa acción de los oligoelementos* en el desarrollo de tallos *in vitro*, pues, el medio White I sólido, bien con ácido β-indol acético o sin él, es menos favorable que adicionado de oligoelementos, a más de que si el medio no los contiene, el proceso de formación de clorofila queda inhibido, como lo demuestran los ensayos de las

seriaciones 9) y 10), que incluyen ácido β-indol acético (medios A de Gautheret y White I, sólidos). 2.° Patentízase muy ostensiblemente la *deficiente nutrición* que representa el medio A de Gautheret en el desarrollo *in vitro* de tallos ya que, aun adicionado de ácido β-indol acético, motiva resultados muy poco satisfactorios. 3.° El ácido β-indol acético, al incluirse en un medio nutritivo, ajerce un *efecto inhibidor* o, por lo menos, alterador del proceso de diferenciación o, si se quiere, favorecedor de la indiferenciación así como inhibe, aunque no totalmente, el proceso de formación de clorofila, como atestiguan los cultivos de los tres ensayos en que se incluye, pues todos son más o menos indeferenciados y sólo cuando coexisten con el indol los oligoelementos hay, aunque deficiente, formación de clorofolia la cual no se forma en absoluto cuando se excluyen los oligoelementos. 4.° El ácido β-indol acético motiva en todos los cultivos la muerte de las raíces, y quizá en ello resida la causa por la que los cultivos en él crecidos manifiestan indiferenciación e insuficiente desarrollo (compárese con lo dicho para las formas de tránsito en las experiencias con medio White I sólido con oligoelementos). Aunque en este caso ello no sería sino consecuencia indirecta del propio ac. β-indol acético, pues al motivar éste la muerte de las raíces ocasionaría la pérdida del equilibrio nutritivo necesario a la cepa caulinar.

12) *Medio White I sólido con vitaminas B_1 y B_6*

Los cultivos en los cuales se ensayó la acción de las vitaminas B_1 y B_6 lo son, al igual que anteriormente, en número de 10, siendo la cepa de 2 a 3 mm.

En ellos, a los diez días, se producen dos raicillas de bastante longitud (cerca de 1 cm.), comenzando el ápice de la cepa caulinar un rápido crecimiento hasta alcanzar 1 cm. de tamaño, y su color es verde ; a los veinte días aparecen dos nuevas raíces que, saliendo de la porción basal del tallo, se orientan hacia el agar, penetrando en él por separado. Estas raicillas presentan pelos absorbentes desarrollados, siendo completamente blancas y vigorosas. El tallo crece rápidamente, alcanzando 2 cm. y mostrando en su extremo una hoja ancha y verde, continuando así el crecimiento para, a los treinta días, además de alcanzar

METODO PROPIO. MEDIO WHITE I CON VITAMINAS B_1 y B_6

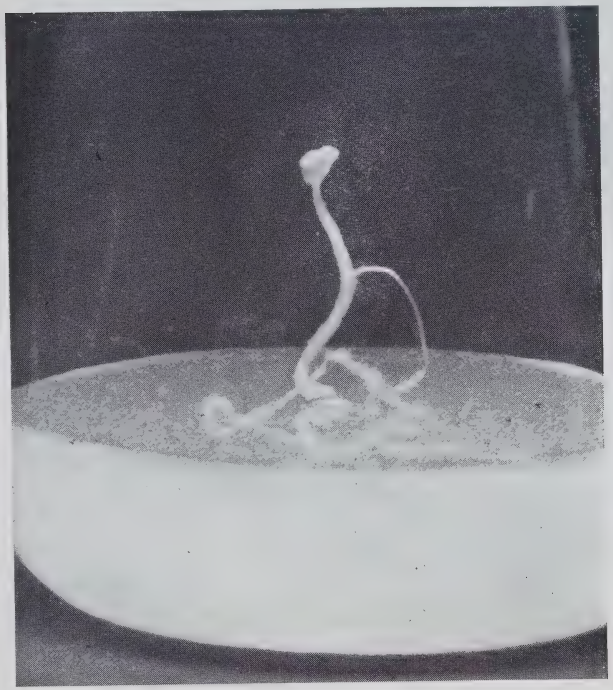


Foto 28 y dibujo XXVIII.—Aspecto de un cultivo, a los 40 días de su siembra, mostrando una formación caulinar (*f*) poco diferenciada y raicillas extendidas por fuera y en la superficie del medio sólido.

(*Original.*)

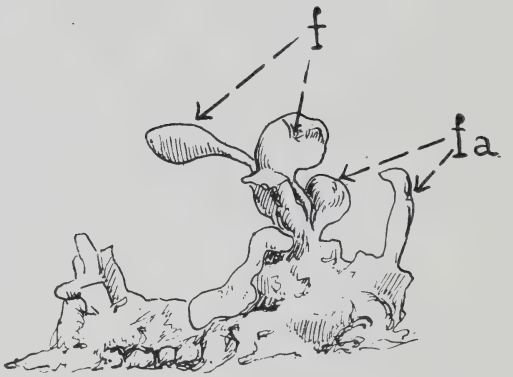


Foto 29 y dibujo XXXX.—Aspecto de un cultivo análogo al anterior, a los 40 días de su siembra. mostrando mayor cantidad de formaciones caulinares poco diferenciadas.

(*Original.*)

algunas raíces de 3 cm. de longitud, estando 1 cm. de ellas en la superficie sólida del medio, el tallo logra 3 cm., con una hoja de 0,5 cm., y a los cuarenta días el vástago mide 4 cm.; pero presenta tan sólo la misma anterior hoja. El cultivo contiene una plántula verde en activo crecimiento, pero sin gran tamaño y, además, un aparato radicular con gran vitalidad y extensión. Se procedió a la renovación del medio a los cuarenta y cinco días para después verificar las resiembras en número de 5, y en todas se obtuvieron cultivos con análogos datos, aspectos y resultados a los de siembra ya referidos.

Si la cepa caulinar contenía raicilla (de ± 2 mm), a los diez días ésta se mantiene en la superficie, mostrando de modo claro sus pelos absorbentes, apareciendo luego 5 tallos verdes de 1 cm. a 0,5 cm., con una pequeña hoja en su extremo, y a los veinte días la raicilla sembrada da lugar a otras dos, así como también aparecen 4 tallos más, de unos 0,5 cm., desarrollándose los anteriores hasta alcanzar dimensiones de 2 y 1,5 cm., terminando todos ellos con la ya citada hoja verde. El crecimiento continúa así hasta los treinta días para, a los sesenta, alcanzar uno de los vástagos caulinares 1 cm. de tamaño. La RESIEMBRA se realiza a los cuarenta y cinco días de la siembra, repitiéndose cinco veces, originando siempre cultivos análogos a los de siembra descritos.

Las fotos números 28 y 29 muestran aspectos de dos cultivos de la referida seriación, mostrando uno (foto 28 y dibujo XXVIII (cepa caulinar sin raicillas) parte del aparato radicular fuera del agar y el otro (foto número 29 y dibujo XXIX (cepa caulinar con raicilla) la brotación de la cepa y las formaciones caulinares originadas.

Por tanto, las vitaminas B_1 y B_6 adicionadas al medio White I sólido constituyen un aporte nutritivo insuficiente, pues no alcanzan en él las cepas biológicas el aspecto normal que es desear (compárese con White I sólido con oligoelementos, foto núm. 21). Además, el número de formaciones foliares en las plántulas es muy limitado, una hoja por tallo y, en contraposición, el desarollo de las raíces es mucho mayor, tanto si la raíz fué inicialmente sembrada por contenerla la yema como si tuvo que formarse en la cepa caulinar (cepa caulinar sin raicilla).

Y como consecuencia final, se revaloriza todavía más la im-

portancia que cabe asignar a los oligoelementos en el cultivo de tallos «in vitro».

13). *Experiencias en la oscuridad.*

Por haberse determinado como método y como aporte nutritivo más favorable el método propio y medio White I sólido con oligoelementos, respectivamente, la seriación de ensayos destinada a estudiar el efecto de la luz, se concretará a tal proceder técnico y con tal referido aporte nutritivo tan sólo.

Los cultivos fueron 5 y siempre con resultados negativos y muy deficientes, pues, las cepas caulinares si bien no pierden por completo la vitalidad, si permanecen con apenas crecimiento caracterizándose, además, por un aspecto enfermizo, no verde, con hojas muy tenues y delgadas, a modo de filamentos transparentes, y con un tamaño total para cada vástago, de tan sólo algunos milímetros. Estos hechos parecen indicar, puesto que las yemas son colocadas en la oscuridad antes de empezar su diferenciación, es decir, recién aisladas como es condición para el cultivo «in vitro», que si bien la luz tiene como efecto general sobre el crecimiento una acción enanizante en las yemas sembradas al no exponerlas a la luz, debe habérseles influído los procesos de diferenciación, así como su potencial de desarrollo, ya que cuando se traladan cultivos a la oscuridad, que contengan vástagos caulinares ya desarrollados, éstos presentan siempre el natural efecto de elongación propio de un crecimiento en la oscuridad (foto núm. 24).

V) Discusión e interpretación de los resultados

La discusión de los resultados obtenidos en nuestras experiencias, siempre realizadas sobre Atropa Belladonna L., es efectuada considerando los hechos objetivos observados, primero, para luego en cada uno de ellos, razonar las causas que, en nuestro criterio, los motivaron así como considerar las interpretaciones factibles dentro de la Fisiología Vegetal. Ordénanse con tal orientación los siguientes apartados:

1. *Aspecto técnico*.—Los tres métodos técnicos ensayados (White, Gautheret y propio) difieren en la fase previa o de formación y aislamieno de la cepa, manifestándose el método propio como el único factible de conseguir las dos finalidades experimentales del cultivo aislado, el estado definitivo e indefinido *in vitro* de los órganos caulinares de la Atropa Belladonna L. Al valor que pueda asignársele, por ser el primer dato totalmente completo de tal hecho, debe añadirse el haber sido obtenido en comparación experimental con todos los otros métodos técnicos que para el cultivo de tallos existen en la actualidad, ya que el de Robbins, único excluído, lo fué por ser idéntico al de White, con la sola diferencia de provenir la cepa caulinar de plántulas crecidas por germinación aséptica en vez de en condiciones naturales y probada, como lo ha sido suficientemente, la natural asepsia del meristemo caulinar puede causalmente ser excluída tal germinación.

El por qué de aquel único resultado satisfactorio es factible de razonar y discutir, atendiendo las siguientes causas:

a) *Técnicas operatorias*.—En este aspecto, los resultados deficientes del *método de White* pueden deberse a los casos, bastante frecuentes, de lesiones que afectarían las zonas meristemáticas de la cepa caulinar y que bien pudieron ser producidas en la delicada disección de su aislamiento, lesiones estas que no siempre pueden ser advertidas y, también, por algunos casos de contaminación accidental posterior a consecuencia de la amplia y dilatada manipulación propia de la misma operación.

En el *método de Gautheret* quizá débanse tales hechos a la contaminación muy frecuente en la fase previa, provocación de yemas en raíz de belladona, si se utilizaron fragmentos radiculares en taleolas, en razón de la difícil asepsia de la superficie cortical, por las rugosidades y relieves que de natural ofrecen, puesto que el uso de prisma reduce, casi en su totalidad, tales casos de infección. Sin embargo, observamos que el método se hace un tanto delicado al tener que proceder con detalle técnico y en condiciones especiales para la formación de yemas, y también aun con ello el número de yemas obtenidas es muy limitado, lo que ofrece serias dificultades si los estudios e investigaciones a realizar precisan, como era el caso nuestro y como ha de ocurrir en ensayos analíticos, un número muy crecido de cultivos de tallos (125-150). Además, y ello es lo más importante, el aislamiento de la yema se hace en el interior de un cultivo sobre medio sólido y mediante seccionamiento que, naturalmente, ha de ser de todo punto inerme y, por tanto, precisa sea muy delicadamente efectuado por cuanto, en consecuencia, tampoco aquí se excluye de modo total las posibilidades de causar lesiones o traumatismos más o menos fácilmente advertidas a las cepas caulinares en su fase de aislamiento (más detalles respecto a estas deficiencias técnicas se consignan en el apartado siguiente de condiciones nutritivas).

La bondad del *método propio* empieza a poderse derivar de la poca complejidad operatoria que soporta, así como de la exclusión de toda norma técnica específica, por basarse en las operaciones generales propias de la técnica *in vitro,* lo que le hace muy asequible y fácil de practicar por una parte, y por otra, quedan evitadas totalmente los casos de contaminación accidental, pues, a las yemas caulinares utilizadas como cepas, tal condición le es congénita por derivar de un cultivo previo de raíces *in vitro*. Por otra parte, la formación de estas yemas no precisa manipulación alguna por cuanto se producen provocando las condiciones deficitarias de nutrición y aerobiosis pertinentes, y ello es posible con sólo dilatar el período de renovación del medio. Se le puede objetar que necesita el cultivo *in vitro* de raíces previamente. Y, en efecto, así es; pero debe tenerse presente el considerable retraso que el cultivo caulinar ofrece respecto al radicular, particularmente lo que hace que este último, al estar

más ampliamente extendido y determinado, sea de relativa fácil consecución y, por tanto, cobra mayor valor, si cabe, el poder ampliar, como primera medida, el cultivo de tallos a las plantas y lo son con cierta amplitud, que ya tiene determinado el de sus raíces.

b) *Condiciones nutritivas.*—El haber ensayado en el transcurso de nuestras experiencias diversas fuentes nutritivas, permite considerar y ofrecer datos y observaciones sobre las exigencias que manifiesta el meristemo caulinar en su desarrollo *in vitro*. Así, para las cepas caulinares aisladas, según *método de White,* se revela como óptimo el medio White I sólido con oligoelementos, con la salvedad de que el estado definitivo alcanzado siempre es de exiguo porte, lo cual cabe interpretarlo en el sentido que por tal método quizás la cepa caulinar no fuera afectada en su funcionalismo en general, pero bien por deficiente absorción, bien por falta de adaptación u otra causa, todavía hipotética, motivaríase un desarrollo insuficiente en tamaño final, así como un número de formaciones foliares escaso y, en consecuencia, no es posible tomar el cultivo caulinar *in vitro* de tales órganos (foto núm. 19) definitivamente conseguido.

Para *el método de Gautheret,* aunque la cepa soportara el aporte nutritivo óptimo (White I sólido con oligoelementos), el estado definitivo alcanzado fué particular y muy ostensiblemente diferente a las crecidas en tierra y, en consecuencia, parece desprenderse que a tales cepas les afecta un funcionalismo alterado, bien en su potencialidad de desarrollo (insuficiente desarrollo adquirido), en su polaridad y diferenciación (organización y aspecto distinto) e incluso en su vitalidad y ritmo proliferativo (estado de crecimiento activo limitado).

Estos hechos quizá puedan responsabilizarse en que tales yemas fueran especialmente formadas a partir del líber de raíz, o por haber soportado condiciones nutritivas insuficientes (medio A de Gautheret), que provocarán un desequilibrio en su proceso nutritivo o incluso a que en su aislamiento se hubiera afectado mecánicamente la propia cepa ; y por todos estos motivos, aislados o conjuntos, se tendría como resultante una cepa biológica de funcionalismo alterado que mostraría un desequilibrio funcional, bien en su potencialidad de desarrollo, bien en su

organización, bien en su deferenciación, etc., bien, incluso, en cuanto al ritmo proliferativo y limitando su vitalidad, y también, quizá, por efectos sobre algunos pigmentos respiratorios.

En tal sentido, el *método* propio es el más satisfactorio posible, ya que las cepas caulinares formadas, aisladas y sembradas cuando el medio fué óptimo, desarrollan un estado definitivo e indefinido completo, originando plántulas similares a las normales de cierto crecido porte, para ser *in vitro* (8 a 9 cm.) y una disposición morfológica, tanto caulinar como foliar, satisfactorias (diez a quince hojas) igualmente en los cultivos de siembra como en los de resiembra. El por qué así ocurre únicamente en nuestra técnica, estimamos puede ser debido a que se evitan las lesiones de la cepa ; pero, sobre todo, a que las cepas son yemas crecidas *in vitro* y, por tanto, ya adaptadas a las condiciones que subsiguientemente van a tener, lo que no ocurre en el método de White (crecidas en tierra), y además a formarse en órganos de naturaleza *reservoria,* incluso de sustancias estimulantes, como las raíces, y en *fase de activa diferenciación* de los tejidos subyacentes radiculares (ocurrido inmediatamente después de la desdiferenciación precisa para alcanzar el estado de tejido embrional preciso para producirse una yema, pues como tal hay que considerar la fase en que los tejidos radiculares se transforman en tejidos caulinares potenciales, engendradores de las yemas (1). En tales momentos, y por tales causas y localización, las yemas habrían como *acumulado* o *potencializado su capacidad de desarrollo, organización, vitalidad,* etc., y a consecuencia de todas estas favorables circunstancias se motivaría bien de modo aislado, actuando por separado cada causa o, lo que es más probable, por armónica interrelación funcional de todas ellas, un desarrollo *in vitro,* con muy satisfactoria vitalidad, diferenciación y disposición organogénica de la plántula, obedeciendo siempre a los rasgos inherentes a la propia naturaleza del

(1) Cabría además aquí establecer una importante diferencia con el método de Gautheret ya que en el método propio las yemas fórmanse si sobre las raíces, al igual que en él, pero no sobre trozos de ellas, más o menos alterados por traumatizados (taleolas o primas), sino sobre órganos radiculares en integridad morfológica y fisiológica. Y esto no cabe duda ha de repercutir y marcar ostensible diferencia en la posible evolución de las dos clases de cepas caulinares por cada método obtenidas.

vegetal de que se trate en nuestro caso particular la Atropa Belladonna L.

2.° *Estado del medio nutritivo.*—El medio nutritivo al estado líquido es evidenciado como desfavorable por motivar cultivos de limitada longevidad e indiferenciación total presentado, además, un desarrollo radicular muy escaso (foto núm. 4 y dibujo IV). Ello corrobora los resultados obtenidos por otros autores (Ball), que admitían como más favorable la condición sólida, y así es ratificado en el desarrollo *in vitro* de órganos caulinares de A. Belladonna L. Sin embargo, la interpretación de tales efectos ofrece serias dificultades, pues todavía existe cierta incomprensión en algunos hechos; así el crecimiento radicular cuando dicho órgano está aislado, sin la interrelación que puedan ofrecerle los tejidos caulinares y foliares, manifiesta desarrollo más favorable para medios líquidos y, sin embargo, cuando coexisten *in vitro* (tallo-hoja-raíz), como así ocurre al cultivar la cepa caulinar, el desarrollo radicular queda casi nulo si el estado es líquido. Además, se advierte que ello está todavía más en contradición con el hecho de que se produzcan génesis de meristemo radicular a partir de cepas caulinares, si el medio es sólido, y no hay tal formación si el medio es líquido. Quizá ello sea debido a que cuando el medio es líquido, el propio meristemo caulinar es capaz de absorber por sí cierta pequeña cantidad de alimentos del medio, por lo que no necesitaría la aparición de órganos radiculares. Ahora bien: tal absorción no puede ser considerada nunca como suficiente sino, al contrario, como muy deficiente, pues el cultivo caulinar, al evolucionar en diferenciación y en crecimiento, necesita incrementar su nutrición y entonces, por continuar ésta con el mismo ritmo con que primeramente se ejerce mediante el propio órgano caulinar, resulta lenta e insuficiente, provocando la aparición de ciertas necrosis, primero, y pérdida de la vitalidad después en algunos casos, y en todos, nunca es posible alcanzar el estado definitivo con gran desarrollo. Pudiera aquí radicar el por qué del insuficiente estado definitivo de la cepa caulinar de Loo (estado líquido del medio).

Por otra parte, la formación relativamente pronta del aparato radicular en el medio sólido lo es siempre, en general, con extensión muy limitada, hasta el extremo de ser sólo una raíz de

1 cm. a 2 cm. tan sólo, aunque robusta y vigorosa. Ello quizá sea consecuencia de la total incapacidad del meristemo caulinar para absorber directamente, con lo que se condicionaría una fase de latencia, en la que el funcionalismo y organización de la cepa caulinar quedan como detenidas, y explicaría además el por qué en los primeros estados del desarrollo caulinar *in vitro* se origina una formación de adaptación más o menos ostensible, según se tratase de cultivos de siembra o de resiembra, mientras que la evolución normal hacia el estado definitivo quedaría en este período como rezagada por predominio de formación radicular. Todo ello fué más ampliamente considerado al describir los resultados obtenidos en los cultivos de resiembra por método propio y medio White I sólido con oligoelementos.

3.º *Determinación del medio nutritivo óptimo.*—El medio más favorable es el *White I sólido con oligoelementos*; sin embargo, la observación y ensayos que sobre nutrición se efectuaron, aconsejan inferir las consideraciones que siguen:

a) *El medio A de Gautheret* muéstrase siempre inadecuado para el desarrollo *in vitro* de órganos caulinares, por la pobreza de elementos nutritivos, motivando cultivos cloróticos de pequeño desarrollo y vitalidad muy limitada, aunque es óptimo cuando se le utilizó en la fase previa de formación de yemas del propio método de Gautheret.

b) *El medio White I sólido* (sin oligoelementos) produce resultados algo satisfactorios, es cierto, pero no óptimos, ya que si bien siempre motiva cultivos de vitalidad ilimitada (estado indefinido), el aspecto de las plántulas es siempre un tanto distinto del normal, caracterizándose éstas, además, por su escasa diferenciación y particularmente por las deficientes formaciones foliares.

c) *El medio White I sólido adicionado de oligoelementos* dió los más óptimos resultados, permitiendo desarrollar plántulas similares a las crecidas en tierra, tanto en cultivos de siembra como en resiembra, según método propio, aunque débese advertir que, en tal método propio, siempre se mostró la presencia de una primaria expansión laminar calificada como de adaptación o tránsito. Esta estaría motivada a consecuencia de un des-

equilibrio en la nutrición de la propia cepa. En otra orientación siempre se produce al utilizar este medio sólido un enraizamiento previo de las cepas caulinares, lo que prueba la incapacidad del meristemo caulinar para la absorción directa de nutrientes.

4.° *Acción de los elementos estimulantes ensayados.*—El haber incluído en los medios nutritivos tres distintas calidades de sustancias de acción estimulante o excitoformadora, permite realizar una serie de observaciones destinadas a determinar concretamente la acción correspondiente al ácido β-indol acético y a las vitaminas B_1 y B_6, sustancias que por su general uso en la técnica *in vitro,* presentan siempre interés.

a) Para el *ácido β-indol acético* los resultados obtenidos, tanto si se adiciona al medio A de Gautheret, como al White I sólido, como al medio óptimo (White I sólido con oligoelementos), evidencian claramente una acción desfavorable manifestada con efectos cloróticos y de ostensible indiferenciación, lo que permite indicar en un aspecto general, aunque siempre particularizado a la belladona como única planta ensayada, que tal sustancia produce una acción desfavorable en la diferenciación que los meristemos caulinares precisan para su desarrollo normal *in vitro* y, también, en el proceso de la formación de clorofila.

b) *Las vitaminas B_1 y B_6* muéstranse en nuestras experiencias como algo favorables, pero no totalmente, pues originan un crecimiento radicular en los cultivos caulinares, mucho más ostensible y vigoroso que el propio de los cultivos óptimos (método propio), pero en cambio el desarrollo del tallo es siempre pequeño y nunca alcanza aspectos de total normalidad sino que, por el contrario, queda caracterizado por una relativa poca intensidad de crecimiento.

5.° *Acción de los oligoelementos (Fe, Mn, Zn, Bo).*—Una consideración comparativa de los resultados permite inferir la gran trascendencia que parece tienen los oligoelementos para obtener el desarrollo caulinar *in vitro* con la intensidad de desarrollo suficiente que permita el máximo porte de las formaciones caulinares alcanzadas y, también, para que ocurra igualmente con el potencial de diferenciación y organización (semejanza con

las crecidas en tierra), la vitalidad y el ritmo proliferativo (longevidad y crecimiento ilimitado). De modo más concreto, y en el sentido puramente funcional, la diferenciación celular y el proceso de formación de clorofila son favorablemente influídos, como se demuestra al considerar las tres seriaciones experimentales efectuadas con el ac. β-indol acético.

6.º *Acción de la luz.*—Las experiencias que con exclusión de luz se realizan señalan la importancia de este factor en el desarrollo de tallos *in vitro*, pues en la oscuridad los resultados son totalmente y en absoluto negativos, ya que la yema caulinar permanece sin mostrar crecimiento diferenciado alguno, aunque sí un extenso aparato radicular.

7.º *Renovación del medio.*—El mantenimiento de la vitalidad y la organización, una vez desarrollada la cepa biológica, y la ilimitada proliferación habida *in vitro* condicionan un gradual, pero progresivo, agotamiento del medio nutritivo haciendo indispensable la renovación del medio que por el particular aspecto de los cultivos (tamaño y forma) preséntase como bastante dificultosa. Para realizar esta renovación se procedió a transferir de modo total las formaciones caulinares mediante arrancamiento de la plántula y observando, pese a sus dificultades, resultados satisfactorios, con tal de operar cuidadosamente y estar en posesión de cierta práctica.

Si no se renueva el aporte nutritivo, se observa cómo va disminuyendo el ritmo de crecimiento de las formaciones caulinares, y cuando el gel nutritivo muéstrase muy disminuído o retraído, caso de deshidratación manifiesta (foto 25), se ocasionan acciones morfológicas, condicionadas por dificultad en la absorción hídrica, tales como marchitez de las formaciones caulinares y foliares ya formadas y, también, una mayor extensión, de forma exageradísima, de su aparato radicular en su intento de compensar el balance hídrico que empieza a ser deficitario. Este último punto es de suma importancia ya que, como antes se refiere, el aspecto definitivo óptimo es solidario de la aparición del aparato radicular. Ciertamente, pero siempre cuando éste se mantenga con una muy limitada dimensión y extensión, probablemente porque resultando ya suficiente para la absorción exi-

gida por el natural crecimiento de las formaciones caulinares, no debe interferir a éstos ni en diferenciación ni en el propio aprovechamiento de nutrientes, por cuanto compruébase que siempre que se produce un desarrollo radicular excesivo, ensayos con vitaminas B_1 y B_6, y en la oscuridad, hay como contrapartida un deficiente desarrollo caulinar en tamaño, organización y crecimiento.

Por último, y de modo conjunto, el transcurso de las experiencias, sus resultados y la discusión e interpretación de los mismos, demuestran lo complejo del cultivo *in vitro* de tallos, al necesitar una interrelación funcional que, como es lógico, tradúcese en procesos de correlaciones organogénicas externas. Así cabría suponer, en nuestra opinión, que el aparato radicular fuera necesario apareciese previamente pero también que adquiriese sólo un cierto desarrollo en longitud y ramificaciones para así producirse el cultivo caulinar, ya que sólo cuando el aspecto del cultivo de tallos es de exiguo porte o de indiferenciación manifiesta, el aparato radicular fué más crecido y ramificado (vitamina B_1 y B_6, deshidratación del medio). Esto explicaría el por qué cuando se siembra una cepa con raícilla adherida queda ésta como detenida en su crecimiento hasta alcanzar el mismo discreto porte que cuando la cepa no la contuvo, pero con menor tamaño y vigor que para este último caso, lo que se traduce en resultados menos satisfactorios (método propio, medio White I sólido con oligoelementos). Por todo ello demuéstrase experimentalmente sobre Atropa Belladonna L., que las yemas radiculares de 2 a 3 mm. de tamaño presentan un potencial de desarrollo, de diferenciación y de vitalidad tal, que les confiere facultad de neoformar a partir de ellas *in vitro,* una verdadera plántula con formaciones caulinares y foliares morfológica y organogénicamente normales, pero precisando valerse, puesto que sustentan incapacidad de hacerlo por sí mismas, de un órgano absorbente accesorio. En consecuencia emiten un aparato radicular limitado, sólo y exclusivamente el preciso y suficiente para tal función, pero nunca en exceso que pueda influir aquella normal formación. Y prueba de que puede influirse por esta causa el desarrollo caulinar es que cuando coexisten órganos radiculares demasiado crecidos y esbozo caulinar, formados a partir de la cepa, este último adquiere muy poco porte en su posterior

desarrollo mientras que las raíces pueden continuar creciendo más y más, como si la dificultad estribara en pasar aquel dintel de discreción en tamaño referido, pero que una vez salvado prepondera ya el crecimiento radicular sobre el caulinar.

Por consiguiente, debe resultar indispensable coordinar adecuadamente la citada coexistencia (órgano radicular y caulinar) en el cultivo *in vitro* de tallos, de modo que se favorezca y, por tanto, así se produzca sólo el esbozo radicular suficiente, a fin de que preponderen las formaciones caulinares, pero debe evitarse ocurra el caso inverso, por cuanto motivaría no un verdadero cultivo caulinar, sino uno radicular.

VI) Conclusiones

De todas cuantas experiencias han sido por nosotros realizadas y que son consignadas, discutidas e interpretadas conjuntamente en esta publicación, cabe inferir las siguientes conclusiones:

I. Se consigue y determina satisfactoriamente, por primera vez en la técnica *in vitro*, el cultivo de órganos caulinares de Atropa Belladonna L. mediante método propio y con un estado definitivo de 8 a 12 cm. y un estado indefinido de trescientos a cuatrocientos días aproximadamente por resiembras sucesivas.

II. Se crea y expone adecuadamente un nuevo método propio para el cultivo de tallos *in vitro*, demostrando su bondan, en comparación con los únicos existentes (White y Gautheret). y su eficiente utilidad, por cuanto puede ser extendido racionalmente a otros vegetales. En consecuencia cabe considerarlo como general y, por otra parte, el peculiar modo de conseguir la cepa caulinar constituye una nueva orientación en este sentido.

III. Se comprueba, por así ratificarse en muchos ensayos, lo inadecuado del estado líquido para los medios nutritivos en el cultivo de los tallos *in vitro*.

IV. Se determina el medio White I sólido con oligoelementos, como el óptimo para el desarrollo *in vitro* de órganos caulinares, particularmente referido a los de Atropa Belladonna L.

V. Queda estudiada, discutida y precisada la acción favorable que en el cultivo de tallos *in vitro* ejercen los oligoelementos (Fe, Mn, Zn, Bo), puntualizándola en ciertos trascendentales efectos (crecimiento en sí, diferenciación y formación de clorofila), y por ello débense considerar como indispensables.

VI. Se determina que la acción influenciativa del ácido β-indol acético sobre el desarrollo de tallos *in vitro*, es desfavora-

ble por cuanto provoca indiferenciación y no formación de clorofila.

VII. Se demuestra asimismo la perjudicial influencia que en el desorrollo *in vitro* de órganos caulinares ejercen la vitamina B_1 y B_6 en razón de determinar un demasiado extenso aparato radicular.

VIII. Se evidencia, en el desarrollo de tallos de belladona *in vitro*, que a la oscuridad pueden formarse yemas pero éstas, en tales condiciones, no desarrollan formaciones caulinares diferenciadas, por lo que ha de considerarse la luz como factor indispensable para aquel desarrollo.

IX. Se aportan nuevos datos demostrativos de la incapacidad del meristemo caulinar, particularizado a los de la A. Belladonna L. para ejercer una absorción directa, lo que condiciona a su vez una previa rizogénesis de la cepa.

X. Se expone una interpretación de la complejidad propia del cultivo de tallos *in vitro*, causa seguramente de su retraso, mediante una supuesta interrelación funcional (aparato radicular excesivo—desarrollo caulinar insuficiente e indiferenciado, aparato radicular limitado—, desarrollo caulinar satisfactorio), de pendiente de la aparición, tamaño limitado y función del aparato radicular, capaz de neoformarse en la propia cepa caulinar, originariamente exenta de todo esbozo radicular.

XI. En resumen, las consideraciones y puntos de conclusión consignados no sólo contribuyen a estudiar los diversos aspectos del cultivo de órganos aislados, sino que son exponente de las posibilidades con que éste se ofrece en la técnica *in vitro*, por cuanto es ya conseguido, de modo totalmente satisfactorio, en el caso particular de la Atropa Belladonna L. y en virud de habernos sido posible demostrar experimentalmente los siguientes puntos trascendentales:

a) Es conseguido por primera vez en la técnica *in vitro* y, por tanto, las anteriores posibilidades son hechos reales en el

cultivo satisfactorio de órganos caulinares aislados de un vegetal determinado: Atropa Belladonna L.

b) Queda demostrada la eficiencia y necesidad de un *nuevo método propio original* para tal clase de cultivos.

c) Instituyese, con caracteres de precisión, una nueva orientación para poder obtener cepas caulinares adecuadas a la finalidad propia del cultivo de tallos *in vitro*.

VII) BIBLIOGRAFIA

ABAD MANRIQUE, J. B.ª, y CARMEN LUNA MORENO: An. de Farmacog. número 13 (1948).

ABAD MANRIQUE, J. B.ª: An. de Farmacog. núm. 14, vol. IX, páginas 39-88 (1949).

— An. de Farmacog. núm. 14, vol. IX, pág. 89-130 (1949).

— y CARMEN LUNA MORENO: «Técnica del cultivo de tejidos vegetales».—Trabajo presentado y premiado en el certamen científico de la 2.ª Semana Farmacéutica Nacional (sin publicar) (1950).

— Farmacog. núm. 16, vol. X, págs. 37-57 (1950).

— «Nutrición en el cultivo vegetal *in vitro*. Medicamenta núms. 38 y 39 (1951).

BALL, E., and E. J. BOELL: Proc. National Acad. Sci. 10: 45-50 (1944).

BALL, ERNEST: Amer. J. of Bot., vol. 33, núm. 5, pág. 301 (1946).

— Amer. J. Bot., págs. 246-262 (1948).

— Amer. J. Bot., 36: 440-454 (1949).

— Amer. J. Bot., 37: 117-136 (1950).

BONNER, J.: Bull. Torrey Bot. Club., 70: 687-692 (1943).

BOUILLENNE, R., et M. BOUILLENNE-WALRAND: Lejeunia, T. 11-2-1947.

— Acad. R. de Belgique, T. XXXIII (1948).

— Leujenia, T. 2-1948.

BUVAT, R.: Ann. Sc. Naturelles, serie XI, tomo VI (1945).

CAMUS GUY, M.: Comp. Rend. Acad. Sci., 219, pág. 34 (1944).

— Comp. Rend. Soc. Biol., 141: 389-391 (1947).

— Comp. Rend. Acad. Sci., 224 (2): 154-156 (1947).

— Comp. Rend. Acad. Sci., París, 226: 1833-35 (1948).

CAPLIN, S. M., and F. C. STEWARD: Nature 163 (4154) 920-21 (1949).

CLEMENT JAQUIOT, M.: Comp. Rend. 229, núm. 10, 529 (1949).

CHILD, C. M.: Ranx. Archf. Entw. 117: 21-66 (1929).

DE ROP, R. S.: Ann. Bot. N. S. 9: 369-381 (1945).

ESAN, R.: Amer. J. Bot. 29: 738-47 (1942).

GAUTHERET, R. J.: Comp. Rend. Acad. Sci., 210-632 (1940).

— Comp. Rend. Acad. Sci., 210-744 (1940).

— Comp. Rend. Acad. Sci., 213: 37 (1941).

— Manuel technique de culture des tissus vegetaux. Masson et Cie. edt. París (1942).

— Le culture de tissus vegetaux. Libr. Gallimard., ed. (1945).

— Comp. Rend. Soc. Bio. 141: 627-629 (1947).

— Comp. Rend. Soc. Biol. 141: 25-29 (1947).

— Comp. Rend. Soc. Biol. 142: 807 (1948).

GATSTON, A. W.: Amer. J. Bor. 35: núm. 5, 281-287 (1948).

GLENN, S. RABIDEAU and W. GORDON WHALEY: Plant. Physiol., v. 25, núm. 2, pág. 334 (1950).
GOEBEL, K.: Biol. Zentralbl. 22: 481-505 (1902).
— Einleitung in die experimentelle Morphologie der Pflanzen. Leipzig (1908).
GORDON WHALEY, W., GLENN, S. RABIDEAU and ELIZABETH L. MOORE: Plant. Physiol., pág. 322, núm. 2, vol. 25 (1950).
HILDEBRANDT, A. C., A. J. RIKER and B. M. DUGGAR: Amer. J. Bot. 357, núm. 7, vol. 32 (1945).
— Amer. J. Bot., vol. 33, núm. 7, 591 (1946).
KEENER, P. D.: Sciense, 102 (2650). 383-384 (1945).
KRAMER and F. W. WENT: Plant. Physiol., vol. 24, núm. 5, pág. 207 (1949).
KULESCHA, Z., and R. J. GAUTHERET: Comp. Rend. Sco. Biol. 141: 61-63 (1949).
— and G. CAMUS: Comp. Rend. Sco. Biol. 142 (5/6), 320-322 (1948).
LA RUE, C. D.: Science, 87 (2254), 240 (1938).
— Proc. National Acad. Sci., 22: 201-209 (1936).
LEVINE MICHAEL: Bull. Torrey Bot. Club., 77. 110-132 (1950).
LIU, TA-CHU: Bot. Bull. Acad. S. 2 (3): 207-210 (1948).
— Bot. Bull. Acad. Sinica (3): 1: 12-15 (1949).
LOO, T. L., et S. W. LOO: Sci. Rep. Nat. Ceut. Univ., serie B, Biol. 2: 51-79 (1935).
— Chin. J. exp. Biol. 1: 189-206 (1936).
LOO, S. W., and WANG, F. H.: Science, 98: 544 (1943).
LOO, SHIH-WEL: Amer. J. Bot. 32: 13-7 (1945).
— Cultivation of excised stem tips and of intaiet plants under sterile conditions. Thesis (California Institute of Thechnology. Pasadena) (1945).
— Amer. J. Bot. 33: 299-300 agr. (1946).
LUNA MORENO, CARMEN: «El cultivo de raíces aisladas de A. Belladonna L., como método en la investigación de la génesis de sus alcaloides.» Tesis. Farmacog núm. 19 (1950).
— Farmacog núm. 20.
MOREL, M. G.: Comp. Rend. Acad. Sci. 230: núm. 11. 1099 (1950).
NOBECOURT, PIERRE: Comp. Rend. Sco. Biol. 140: 953-954 (1946).
— Comp. Rend. Soc. Biol. 141: 590 (1947).
PREVOT, P. C.: Men. Soc. Roy. Sci. de Lieje (ser. 4) 3: 173-340 (1939).
RECHINGER, C.: Verhandl d. k. k. zool. Bot. Ges. Wien. 43: 310-334 (1893).
RIKER, A. J., and GUTSCHE, A. E.: Amer. J. Bot. 35: núm. 4. 227-238 (1948).
ROBBINS, W. J.: Bot. Gaz. 73: 376-390 (1922).
— Amer. J. Bot. 29: 24-245 (1942).
— and MARY STEBBINS: Bull. Torrey Bot. Club., 76 (2) 136-140 (1949).
SEGELITZ, G.: Planta 28: 617-643 (1938).
SKOOG FOLKE and CHENG TSUI: Amer. J. Bot. 35 (10): 782-787 (1948).
— Amer. J. Bot. 35: 782-787 (1948).

SMITH, B. S.: The effect of varioys accesory growth substances on excised stem tips of Helianthus annus S. in vulture. Thesis for. Ph. D. Univ. of Michigan, 92 p. p. (1940).
— Proc. Leeds Phill. acd. Lit. Soc. Sc. Seet. 4: 42-63 (1941).
STERLING, C.: Amer. J. Bot. 32: 380-394 (1945).
THODAY, D.: Nature, 144: 371-575 (1939).
WARDLAW, C. W.: Amer. Bot. N. S. 8: 173-188 (1944).
WENT, F. W.: Plant. Physiol. 13: 55-80 (1938).
WHITE, P. R.: Protoplasma. 19: 97-116 (1933).
— Bull. Torrey Bot. Club. 66: 507-513 (1939).
— Amer. J. Bot. 29: 59-64 (1939).
— Manuel de culture des tissues vegetaux Lancaster Pa. J. Cattel Press. 14: 5 × 21 (1943).

INDICE

Págs.

Prólogo ... 5

I.—Introducción ... 7

II.—Actual estado del cultivo de tallos «in vitro» ... 11

III.—Consideraciones técnicas ... 22

a) Condiciones nutritivas ... 22
b) Preparación previa del material biológico ... 26
c) Técnicas ensayadas ... 30
c_1) Método de White ... 30
c_2) Método de Gautheret ... 30
c_3) Método propio (original) ... 31

IV.—Experiencias y resultados ... 37

A) Método de White ... 38
1) Medio de Gautheret ... 38
2) Medio de White I líquido ... 39
3) Medio White I sólido adicionado de oligoelementos ... 40
A_1) Resultados ... 42
B) Método de Gautheret ... 43
4) Medio A de Gautheret ... 45
5) Medio White I sólido con oligoelementos ... 45
B_1) Resultados ... 46
C) Método propio ... 47
6) Medio A de Gautheret ... 47
7) Medio White I sólido ... 48
8) Medio White I sólido con oligoelementos ... 50
a) Cepas caulinares con raicilla ... 50
b) Cepas caulinares sin raicilla ... 51
9) Medio A de Gautheret con ácido β-indol-acético ... 59
10) Medio White I sólido con ácido β-indol-acético ... 60
11) Medio White I sólido con oligoelementos y ácido β-indol-acético. 61
12) Medio White I sólido con vitaminas B_1 y B_6 ... 62
13) Experiencias en la oscuridad ... 64

Págs.

V.—Discusión e interpretación de los resultados 65

1) Aspecto técnico 65
a) Técnicas operatorias 65
b) Condiciones nutritivas 67
2) Estado del medio nutritivo 69
3) Determinación del medio nutritivo óptimo 70
a) El medio A de Gautheret... 70
b) El medio White I sólido... 70
c) El medio White I sólido adicionado de oligoelementos 70
4) Acción de los elementos estimulantes ensayados 71
a) Acido β-indol-acético 71
b) Vitaminas B_1 y B_6 71
5) Acción de los oligoelementos (Fe, Mn, Zn, Bo) 71
6) Acción de la luz 72
7) Renovación del medio 72

VI.—Conclusiones 75

VII.—Bibliografía 78

Ptas.

17.—INTRODUCCION A LA INTERFEROMETRIA, por C. Sánchez del Río. (24 × 17), 132 páginas 22

18.—TEORIA DE GRUPOS Y FISICA MOLECULAR, por J. F. García de la Banda y Jesús Morcillo. (24 × 17) 35

19.—GENESIS DE LA ARCILLA, por Angel Hoyos y F. González García. (24 × 17), 128 páginas 30

20.—ALGUNOS PROBLEMAS DE BIOQUIMICA VETERINARIA, por L. Seekles. (24 × 17), 64 páginas 15

21.—SUPERMICROSCOPIA ELECTRONICA, por Gonzalo Palacios de Borao. (24 × 17), 162 páginas 60

22.—FUNDAMENTOS TEORICOS DE LA ADSORCION GASEOSA, por Vicente Aleixandre. (24 × 17), 128 páginas 25

23.—LA ESTATICA DEL SISTEMA «SUELO-AGUA», por Angel Hoyos y J. L. Martín Vivaldi. (24 × 17), 152 páginas 35

24.—PSEUDOESTERES, por José Pascual Vila. (24 × 17), 56 páginas ... 20

25.—ASPECTOS ACTUALES DE LA ESPECTROSCOPIA MOLECULAR, por Jesús Morcillo Rubio y Juan F. García de la Banda. (24 × 17), 194 páginas 35

26.—CRISTALOQUIMICA, por José Luis Amorós. (24 × 17), 150 páginas. 35

27.—EL «REGNUM-IMPERIUM» LEONES HASTA 1037, por Alfonso Sánchez Candeira. (24 × 17), 72 páginas 20

28.—SERIES CRONOLOGICAS ESTACIONARIAS, por Herman O. A. Wold. (24 × 17), 76 páginas 25

29.—FRANCESES, PROTESTANTES, TURCOS. LOS ESPAÑOLES ANTE LA POLITICA INTERNACIONAL DE CARLOS V, por Juan Sánchez Montes. (24 × 17), 168 páginas y 10 láminas 35

30.—ESTRUCTURA CRISTALINA DE LOS MINERALES DE LA ARCILLA, por José García Vicente. (24 × 17), 108 páginas 30

UNIVERSITY OF ILLINOIS-URBANA
3 0112 072855643